

UNIVERSIDAD DE CUENCA



FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

“Efecto de la GnRH, benzoato de estradiol y ablación folicular en el tiempo de reinicio de la nueva onda folicular en vaconas Holstein Mestiza en fase luteal”

Tesis de grado previa a la obtención del título de
“Médico Veterinario Zootecnista”

AUTORES. - JESÚS ALEJANDRO PESANTEZ DURAN

CI: 0105634976

JUAN DANIEL SUPLIGUICHA MERCHAN

CI: 1400769822

DIRECTOR. - Dr. JHONNY ALFREDO NARVÁEZ TERÁN. Mg. Sc.

CI: 0102291218

Cuenca – Ecuador

26/02/2019

RESUMEN

El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de la GnRH, benzoato de estradiol y ablación folicular sobre el tiempo de reinicio de la nueva onda folicular en vaconas Holstein Mestiza en fase luteal. La investigación se realizó en la granja de Nero de la Universidad de Cuenca con nueve vaconas entre 15 y 18 meses de edad, clínicamente sanas con un peso mayor a 300 kg, y una CC de 3 en una escala del 1 al 5. La sincronización de la fase luteal de las vaconas se realizó con el uso de un dispositivo intravaginal de progesterona, benzoato de estradiol (BE) y prostaglandina (PGF), 56 horas luego del retiro del implante se evaluó la presencia del folículo pre ovulatorio (FPO). El día 9 post aplicación de la PGF se confirmó la presencia de un cuerpo lúteo funcional y folículo dominante, y se aplicó tres tratamientos, **T1** (n=3) Benzoato de estradiol 2,5 mg IM, **T2** (n=3) GnRH 250 ug IM, **T3** (n=3) ablación de los folículos >5 mm en el primer periodo, y de igual manera en los dos siguientes periodos alternando los tratamientos. Para determinar el tiempo de reinicio de la nueva onda folicular se relacionaron los picos de FSH en sangre con la presencia de la nueva cohorte de folículos reclutados; para medir los niveles de FSH se tomó una muestra de sangre de la vena yugular cada 24 horas durante 4 días post aplicación de los tratamientos, y la presencia de la nueva cohorte de folículos se evaluó mediante ultrasonografía durante 4 días post tratamientos. Se utilizó un diseño experimental de cuadrado latino de 3x3 con tres tratamientos y tres repeticiones en distintos periodos. La administración de BE en este estudio provocó el reinicio de la onda folicular a los 3 días post tratamiento, con la aplicación de GnRH este reinicio se evidenció a los 2,33 días y mediante ablación folicular, se verificó el reinicio a los 2 días. La prueba de Duncan determinó que si existe diferencia significativa ($p < 0,05$) en el tiempo de reinicio de los tres tratamientos usados agrupándolos en diferentes subconjuntos homogéneos, mientras que en los dos tratamientos farmacológicos se observó atresia del folículo dominante.

Palabras clave: GnRH, PROSTAGLANDINA, BENZOATO DE ESTRADIOL, OVULACIÓN.



ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the effect of GnRH, estradiol benzoate and follicular ablation on the restart time of the new follicular wave in Holstein Mestiza vaconas in the luteal phase. The research was conducted in the Nero farm of the University of Cuenca with nine vaconas between 15 and 18 months of age, clinically healthy with a weight greater than 300 kg, and a CC of 3 on a scale of 1 to 5. The synchronization of the luteal phase of the vaconas was performed with the use of an intravaginal progesterone device, estradiol benzoate (BE) and prostaglandin (PGF), 56 hours after removal of the implant, the presence of the pre ovulatory follicle (FPO) was evaluated. On the 9th post-application of PGF, the presence of a functional corpus luteum and dominant follicle was confirmed, and three treatments were applied, T1 (n = 3) Estradiol benzoate 2.5 mg IM, T2 (n = 3) GnRH 250 ug IM, T3 (n = 3) ablation of the follicles >5 mm in the first period, and in the same way in the following two periods alternating the treatments. To determine the restart time of the new follicular wave, the peaks of FSH in blood were related to the presence of the new cohort of recruited follicles; To measure FSH levels, a blood sample was taken from the jugular vein every 24 hours for 4 days after application of the treatments, and the presence of the new cohort of follicles was evaluated by ultrasound during 4 days post treatments. An experimental 3x3 Latin square design was used with three treatments and three repetitions in different periods. The administration of BE in this study caused the restart of the follicular wave at 3 days post treatment, with the application of GnRH this restart was evidenced at 2.33 days and by follicular ablation, the restart was verified at 2 days. The Duncan test determined that there is a significant difference ($p < 0.05$) in the restart time of the three treatments used, grouping them into different homogeneous subsets. During the two pharmacological treatments, atresia of the dominant follicle was observed.

KEY WORDS: GnRH, PROSTAGLANDIN, ESTRADIOL BENZOATE, OVULATION.



ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN 15

1.1. OBJETIVOS 16

1.1.1 Objetivo general 16

1.1.2 Objetivos específicos 16

1.2. HIPÓTESIS..... 16

2. MARCO TEÓRICO 17

2.1. Fisiología de la reproducción 17

2.1.1. Ciclo estral 17

2.1.2. Fases del ciclo estral 18

 Proestro: 18

 Estro: 18

 Metaestro:..... 19

 Diestro: 19

2.1.3. Desarrollo del cuerpo lúteo. 19

2.2. Dinámica folicular 19

2.2.1. Foliculogénesis..... 20

 Fase de reclutamiento 20

 Fase de selección..... 21

 Fase de dominancia 21

2.2.2. Vascularización folicular 22

2.3. Biotecnologías reproductivas 23

2.3.1. Superovulación..... 23

2.3.2. MOET 23

2.3.3. PIV 24

2.3.4. Factores que influyen en la superovulación 24

2.4. Diferencia entre razas..... 25

2.5. Hormonas que intervienen en la actividad reproductiva 25

2.5.1. Progesterona..... 25

2.5.2. Prostaglandina F2 α (Cloprostenol)..... 26

 Farmacocinética del cloprostenol 26

2.5.3. Benzoato de estradiol..... 27

 Farmacodinamia del Benzoato de estradiol..... 27

 Farmacocinética del benzoato de estradiol 28

2.5.4. Gonadorelina (análogo de la GnRH) 28

 Farmacodinamia de la gonadorelina..... 29

 Farmacocinética de la gonadorelina 29

2.5.5. Hormona folículo estimulante (FSH) 29

2.6. Ablación folicular 30

2.7. Ultrasonografía 30

2.8. Extracción y análisis de sangre 31

2.8.1. Toma de muestra de sangre de la vena yugular 31

2.8.2. Electroquimioluminiscencia 32

3. MATERIALES Y MÉTODOS..... 34

3.1. Materiales 34



3.1.1. Físicos.....	34
3.1.2. Biológicos.....	34
3.1.3. Químicos.....	34
3.2. Métodos.....	35
3.2.1. Área de estudio.....	35
3.2.2 Características de la unidad de análisis.....	35
3.3. Metodología.....	35
3.3.1. Sincronización previa al tratamiento.....	35
3.3.2. Protocolos para reiniciar la onda.....	36
3.3.3. Inicio de los tratamientos.....	36
3.3.4. Diseño experimental.....	37
4. RESULTADOS.....	40
4.1. Comportamiento del folículo dominante.....	40
4.2. Niveles séricos de FSH.....	41
4.3. Día de reinicio de la onda folicular mediante ecografía.....	42
4.4. Número de folículos en el reinicio de la onda.....	43
4.5. Comportamiento del cuerpo lúteo.....	44
5. DISCUSIÓN.....	45
Primer tratamiento, benzoato de estradiol.....	45
Segundo tratamiento, GnRH.....	46
Tercer tratamiento, ablación folicular.....	47
6. CONCLUSIONES.....	48
7. RECOMENDACIONES.....	49
8. BIBLIOGRAFÍA.....	50



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Desarrollo folicular.....	22
Figura 2. Protocolo de sincronización del ciclo estral y aplicación de los tratamientos.....	36
Figura 3. Valores promedios del comportamiento del folículo dominante.	40
Figura 4. Valores promedio de los niveles de FSH durante el experimento. ...	42
Figura 5. Valores promedio del día de reinicio de la onda folicular y el número de folículos por tratamiento.	44
Figura 6. Valores promedios del comportamiento del cuerpo lúteo.....	44



UNIVERSIDAD DE CUENCA

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Valores estadísticos descriptivos de los niveles de FSH en ng/dl.....	41
Tabla 2. Valores estadísticos descriptivos del día de reinicio de la onda folicular mediante ecografía.....	42
Tabla 3. Test de Breusch-Pagan modificado para heterocedasticidad a,b,c. ..	43



ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Prueba de normalidad, Shapiro-Wilk.	61
Anexo 2. Cuaderno de campo.	61
Anexo 3. Manejo de los animales al establo.....	62
Anexo 4. Sincronización del ciclo sexual.	62
Anexo 5. Aplicación de los tratamientos.	63
Anexo 6. Monitoreo ecográfico de la onda folicular.	63
Anexo 7. Ecografía de folículo preovulatorio.	64
Anexo 8. Toma de muestras de sangre.....	64



Cláusula de Propiedad Intelectual

Juan Daniel Supliguicha Merchan, autor/a del trabajo de titulación "Efecto de la GnRH, benzoato de estradiol y ablación folicular en el tiempo de reinicio de la nueva onda folicular en vacas Holstein Mestiza en fase luteal", certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autor/a.

Cuenca 26 de febrero de 2019

Juan Daniel Supliguicha Merchan

C.I: 1400769822



Cláusula de licencia y autorización para publicación en el Repositorio
Institucional

Juan Daniel Supliguicha Merchan en calidad de autor/a y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación "Efecto de la GnRH, benzoato de estradiol y ablación folicular en el tiempo de reinicio de la nueva onda folicular en vaconas Holstein Mestiza en fase luteal", de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN reconozco a favor de la Universidad de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Asimismo, autorizo a la Universidad de Cuenca para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el repositorio institucional, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca 26 de febrero de 2019

Juan Daniel Supliguicha Merchan

C.I.: 1400769822



Cláusula de Propiedad Intelectual

Jesús Alejandro Pesantez Durán, autor/a del trabajo de titulación "Efecto de la GnRH, benzoato de estradiol y ablación folicular en el tiempo de reinicio de la nueva onda folicular en vacas Holstein Mestiza en fase luteal", certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autor/a.

Cuenca 26 de febrero de 2019

A handwritten signature in blue ink, consisting of stylized letters, positioned above a horizontal line.

Jesús Alejandro Pesantez Durán

C.I: 0105634976



Cláusula de licencia y autorización para publicación en el Repositorio
Institucional

Jesús Alejandro Pesantez Durán, en calidad de autor/a y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación "Efecto de la GnRH, benzoato de estradiol y ablación folicular en el tiempo de reinicio de la nueva onda folicular en vaconas Holstein Mestiza en fase luteal", de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN reconozco a favor de la Universidad de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Asimismo, autorizo a la Universidad de Cuenca para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el repositorio institucional, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca 26 de febrero de 2019

Jesús Alejandro Pesantez Durán

C.I: 0105634976



UNIVERSIDAD DE CUENCA

AGRADECIMIENTO

Ante todo nuestro gran agradecimiento a nuestro padre Dios por brindarnos salud y bienestar para llevar a cabo este trabajo.

A la Universidad de Cuenca Facultad de Ciencias Agropecuarias y a todo el personal de la carrera Medicina Veterinaria y Zootecnia, por brindarnos todos sus conocimientos y abrirnos las puertas para estudiar en tan prestigiosa institución.

A nuestro director de tesis Jhonny Narváz M.V.Z Mg Sc, por su paciencia, dedicación y esmero para guiarnos en esta bella profesión y brindarnos la confianza necesaria para que este trabajo concluya de la mejor manera.

A los docentes Luis Ayala M.V.Z Mg Sc, PhD; Guillermo Guevara M.V.Z Mg Sc, PhD; Fernando Perea M.V.Z Mg Sc, PhD; y a todos quienes aportaron de manera desinteresada aportando con sus conocimientos para poder realizar esta investigación.

De igual manera a nuestros amigos y futuros colegas, Miguel Naulaguari, Santiago Sarmiento, Julio Romero, y a todo el personal que labora en la granja de Nero de la Universidad de Cuenca por toda su ayuda brindada muchas gracias.

JESÚS PESANTEZ D.

JUAN SUPLIGUICHA M.



UNIVERSIDAD DE CUENCA

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a mis padres queridos, a mis hermanas, abuelos, tíos y a mi enamorada Paola, quienes me brindaron todo su apoyo incondicional y fueron un gran pilar para mi vida estudiantil.

JESÚS ALEJANDRO PESANTEZ D.



DEDICATORIA

A Dios.

Por haberme brindado salud y sabiduría para poder llegar hasta este punto de mi vida.

A mi madre María.

Por todo su apoyo incondicional, por todos sus consejos y valores inculcados a lo largo de mi corta vida para formarme como una persona de bien pero especialmente por todo su amor.

A mi padre Luis.

Por todos sus sabios consejos, su gran ejemplo a seguir y sobre todo por la perseverancia que me ha demostrado para seguir adelante.

A mi familia.

A mis abuelos, Manuel Supliguicha, Rosa Alvarado, a mis tías, Patricia, Libia, Rosario, Teresa, Jaime, a mi hermano Fabián por ser un ejemplo de persona como mi hermano mayor y a todos mis hermanos: Eduardo, María, Gisela, Jhandry, Josselyn, Yonsu y a todos mis sobrinos para que vean en mí un ejemplo a seguir.

A mis amigos.

A mis estimados amigos de mi querido cantón Limón Indanza, quienes directa o indirectamente me apoyaron para alcanzar esta meta.

JUAN DANIEL SUPLIGUICHA M.

1. INTRODUCCIÓN

La necesidad de aprovechar el material genético de animales de alta producción ha permitido el desarrollo de biotécnicas reproductivas como superovulación, MOET, PIV entre otras (1), por lo tanto el control exógeno de la onda folicular antes de iniciar estos protocolos nos ofrece un momento óptimo independientemente del estadio del ciclo estral, además es práctico y fácil de aplicar, eliminándose la necesidad de detectar estro u ovulación y esperar 8-12 días para iniciar el tratamiento con FSH (2). Determinar el inicio de la onda folicular nos permite conocer el momento exacto de aplicación de FSH y promover el desarrollo de un mayor número de folículos que se encuentran en fase de reclutamiento (3). Actualmente el uso de estas biotecnologías se encuentra muy por debajo de las expectativas generadas en la especie bovina (4), ya que algunos factores como la raza (5), medioambiente, alimentación y manejo (6) influyen en el comportamiento folicular provocando esta baja respuesta (7), por lo tanto ya se han realizado varios estudios en razas de carne y ganado Boss Indicus, que describen a profundidad el reinicio de la onda folicular mediante el uso de Estradiol, GnRH y Ablación folicular (8) pero se han encontrado diferencias de la dinámica folicular entre Bos Taurus y Bos indicus tanto para leche como para carne que pueden afectar la aplicación de biotecnologías reproductivas (9). En la década de los 90 se desarrollaron tratamientos con esteres de estradiol y progestágenos induciendo atresia folicular y la aparición de una nueva onda 4 días después (8), un método alternativo consiste en eliminar por punción ultrasonográfica los folículos mayores de 5mm e inducir el reinicio de la onda 1,5 días después (10), otra alternativa es el uso de GnRH para inducir la ovulación del folículo dominante teniendo así el reinicio de la onda 1,5 a 2 días después (11), estas discrepancias entre cada tratamiento (8), la limitada investigación en las razas de Boss Taurus y Boss Indicus que ha llevado a ajustes en la terapia hormonal para el manejo del ciclo reproductivo (12) y el aumento poblacional en las zonas ganaderas provocando el desplazamiento de las mismas a zonas más elevadas nos ha incentivado a investigar la eficiencia de cada tratamiento para la aplicación de biotecnologías como FIV y MOET en vaconas de raza lechera a 3100msnm.



1.1. OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo general

- Determinar el tiempo de inicio de la nueva onda folicular en vaconas Holstein Mestizas en fase luteal luego de la aplicación de GnRH, benzoato de estradiol y ablación folicular.

1.1.2 Objetivos específicos

- Determinar la atresia u ovulación del folículo dominante y el crecimiento de la nueva onda folicular mediante ultrasonografía en los tres tratamientos.
- Establecer los niveles de FSH post aplicación de los tratamientos.
- Relacionar el pico de FSH en sangre con la aparición de la nueva cohorte de folículos reclutados.

1.2. HIPÓTESIS

Existe variación en los tiempos de reinicio de la nueva onda folicular entre los tratamientos con estradiol, GnRH, y ablación de folículos.



2. MARCO TEÓRICO

2.1. Fisiología de la reproducción

En casi todas las especies está regulada por un mecanismo neuro-hormonal sincronizado pues se inicia con cambios químicos en varias partes y que empieza a manifestarse en el cortejo, las hormonas foliculoestimulante (FSH), luteinizante (LH) de la hipófisis producen la maduración gonadal y la esteroidogénesis, pero existe otra hormona del hipotálamo que permite a la hipófisis liberar las gonadotropinas, la GnRH, cuyo gen regulador está situado en el cromosoma 8, es un decapeptido que se ha conservado desde los peces hasta el hombre. A su vez, esta hormona se genera por pulsos que los esteroides desencadenan en el hipotálamo, pero como su cantidad es pequeña y su vida media es corta, se sugiere que existe una síntesis local de la misma hormona en el receptor, como se ve existe un mecanismo complejo en el sistema de reproducción en el que intervienen, además otros factores como endorfinas, el GABA, la dopamina, la noradrenalina y la serotonina y, y factores no esteroideo locales como la inhibina y la activina (13).

La FSH, en la hembra, actúa sobre los folículos, produciendo su crecimiento además de iniciar la secreción de estrógenos, que, al alcanzar niveles determinados, inhibe la secreción hipofisaria de la FSH (2).

La LH produce la ruptura del folículo y así se produce la ovulación y el folículo que nutrió por algún tiempo al óvulo, por efecto de esta hormona, crece y da origen al cuerpo lúteo, mismo que empieza a secretar progesterona, hormona indispensable durante la preñez (13).

Otras hormonas además de los neurotransmisores antes mencionados, hormonas como la inhibina y la activina regulan la liberación de FSH y LH, la inhibina previene la alta regulación de los receptores bloqueando la estimulación de la síntesis de receptor GnRH producida por la misma hormona, mientras que la activina estimula la síntesis del receptor a GnRH (13).

2.1.1. Ciclo estral

En los bovinos el ciclo estral es cada 21 días en promedio con un rango de 17-24 días (14). El ciclo estral presenta el patrón cíclico de la actividad ovárica que



facilita el paso de las hembras de un periodo no receptivo a la receptividad en última instancia permitiendo el apareamiento y posterior establecimiento de la preñez (15). Cuando la hembra llega a la pubertad sufre una serie de cambios en su conducta sexual denominándose ciclo estral, se produce continuamente durante todo el año, a excepción del periodo de gestación o de balance energético negativo en el cual prevalece el anestro, denominándose a las hembras bovinas como poliéstricas continuas (5), un componente que se sabe influye de manera importante es la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH). Los cambios en las tasas de síntesis y liberación de GnRH, así como la velocidad de degradación de dicha hormona, son factores adicionales que modifican su papel en la influencia sobre la liberación de gonadotropinas. A nivel del ovario, el periodo estrual se caracteriza por una elevada secreción de estrógenos a partir de los folículos de Graf preovulatorios. Los estrógenos estimulan el crecimiento uterino por un mecanismo en el que participan la interacción de la hormona con receptores y el incremento en procesos sintéticos dentro de las células. Los estrógenos también estimulan la producción de prostaglandinas por el útero (16), durante cada ciclo estral, los ovarios bovinos sintetizan y secretan estrógenos y progesterona, los cuales coordinan la función del sistema reproductivo femenino (17).

2.1.2. Fases del ciclo estral

La especie bovina se la clasifica como poliéstricas continua, su ciclo estral se ha dividido en periodos de acuerdo a los cambios fisiológicos, endocrinos y morfológicos, estos periodos se describen a continuación:

Proestro: dura de 3 a 4 días, comienza con la regresión del cuerpo lúteo y finaliza con la aparición del celo, con la caída de los niveles de progesterona, esta disminución inhibe el efecto de retroalimentación negativa a nivel hipotalámico por el cual el efecto pulsátil de la FSH y LH aparece para estimular el crecimiento folicular.

Estro: dura de 2 a 24 horas en este periodo la hembra alcanza niveles elevados de estrógenos provocando la secreción de feromonas cuyo olor atrae y excita al toro, también permite que la hembra se muestre receptiva al macho presentando



signos de inquietud, ansiedad y brama con frecuencia, internamente existe edematización de la vulva secreciones vaginales e incremento del tono miometral (18).

Metaestro: el periodo inmediato a la finalización del celo, es el metaestro y dura 6 días en promedio. En este periodo ocurre la ovulación de la vaca, a diferencia de otras especies que lo hacen durante el celo, la ovulación ocurre 28 a 32 horas después de iniciar el celo y es desencadenado por el pico de LH, a la ovulación sigue hemorragia profunda y el folículo se llena de sangre convirtiéndose en cuerpo hemorrágico, todos estos cambios finalizan al séptimo día con un cuerpo lúteo funcional (18).

Diestro: esta fase se caracteriza por el dominio del cuerpo lúteo.

2.1.3. Desarrollo del cuerpo lúteo.

El cuerpo lúteo se forma a partir de la ovulación, por la rotura del folículo, las células de la granulosa sufren un cambio de secreción de estrógenos a progesterona denominado luteinización que inicia con el pico de LH y culmina con la ovulación, el patrón cíclico de liberación de LH mantiene al cuerpo lúteo tanto en animales gestantes como en no gestantes(18)

2.2. Dinámica folicular

La dinámica folicular en la hembra bovina es desencadenante de los procesos reproductivos y de las fases del ciclo estral, sin embargo, estos eventos están regulados por un complejo conjunto de factores que se interrelacionan y permiten que se presente la ovulación como punto final del ciclo estral (19), por lo tanto en un ciclo reproductivo normal una onda folicular se puede definir como el desarrollo armónico de varios folículos antrales pequeños, en promedio 24 por onda con un rango de 8 a 41, éstos son reclutados de los folículos primordiales de una población establecida durante el desarrollo embrionario, de los cuales uno o más se seleccionan como folículos preovulatorios y maduran hasta ovular (20).



2.2.1. Foliculogénesis

El proceso de formación de folículos primordiales comienza durante el desarrollo fetal bovino, aproximadamente a los 80 días de gestación. Existe gran variación individual en el número de folículos, existiendo un pool de reserva ya al nacimiento de unos 2'700.000 folículos primordiales constituidos al final del ensamblaje folicular, 90% degeneran, quedando al nacimiento aproximadamente 135.000 células germinales las cuales declinan rápidamente hasta la pubertad y luego de ella (21). La foliculogénesis comprende una serie de procesos recurrentes de reclutamiento, selección, crecimiento, maduración y ovulación durante el ciclo estral de la hembra, regulados por una combinación de interacciones entre hormonas, factores de crecimiento, sistemas de comunicación celular y genes(22).

El desarrollo folicular se produce en ondas, las ondas foliculares son el desarrollo armónico y simultáneo de los folículos primordiales (23), funcionando a través de estadios integrados de reclutamiento, selección y dominancia folicular (24).

Fase de reclutamiento

Esta dada por el desarrollo de una cohorte de folículos que comienza a madurar bajo un aporte adecuado de gonadotrofinas que le permitan avanzar hacia la ovulación (25). La emergencia folicular se caracteriza por ser un proceso donde un grupo de folículos crecen simultáneamente en el ovario estimulado por un pico de FSH (26). La capacidad de la activina para estimular el número de receptores de FSH en los centros indiferenciados de la granulosa podría ser importante en la transición de los folículos para volverse dependientes de las gonadotropinas y por lo tanto pasar a la siguiente fase principal de crecimiento (27). Los niveles basales de FSH en plasma varían de 0,13 a 0,8 ng/ml en vaconas prepúberes (28), el día de máxima concentración de FSH antes de cada onda folicular se define como el día de mayor concentración dentro de los 5 días de la aparición de una onda (29). Factores intraovaricos estimulados por la FSH están involucrados en el proceso de reclutamiento folicular y los IGF (factores de crecimiento ligados a la insulina) y sus proteínas de enlace (IGFBP) han sido implicados en la amplificación de la acción de la FSH (24), durante esta fase los



folículos se caracterizan por observarse mediante ultrasonografía, con 3 a 4 mm de diámetro (30).

Fase de selección

Es el proceso por el cual un folículo evita la atresia con la posibilidad de llegar a la ovulación (25).

Fase de dominancia

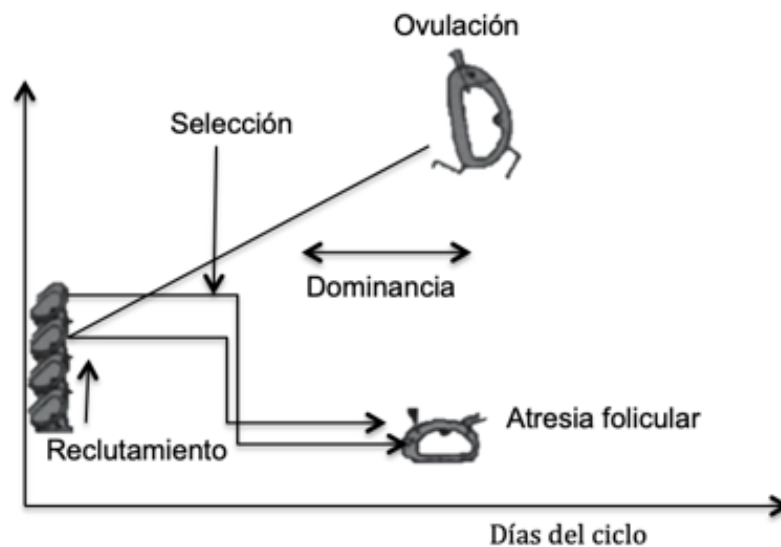
Es el proceso por el cual el folículo seleccionado ejerce un efecto inhibitorio sobre el reclutamiento de una nueva cohorte de folículos. Este folículo dominante alcanza un tamaño marcadamente superior a los demás (25), la dominancia se produce por medio de algún factor que tiene un efecto de retroalimentación negativa sobre la secreción de gonadotrofinas, entre ellos la inhibina, que es producida por primariamente por las células de la granulosa y reduce directamente la secreción hipofisaria de FSH, la folistatina al unirse a la activina, produce una reducción de la secreción de FSH por parte de la misma (24), durante esta fase se produce la atresia del folículo dominante que no ovula (25). Para Hsueh *et al.*, (31), la atresia es principalmente inducida durante la fase de dominancia folicular y afecta a folículos de todos los tamaños, el 85% de los folículos ováricos tomados en cualquier fase del ciclo estral son atrésicos.

Se ha detectado que las vacas pueden tener ciclos estrales de dos o de tres ondas foliculares promedio, aunque, se pueden encontrar ciclos estrales de una sola onda o de cuatro ondas foliculares. Estudios hechos en novillas Brahman han demostrado que una misma hembra puede presentar ciclos de dos, tres y cuatro ondas foliculares, dependiendo de diversos factores que sugieren adaptaciones de la hembra a las cambiantes condiciones del ambiente (32).

La dinámica folicular no se limita solo al desarrollo de varias ondas foliculares durante el ciclo, sino también al ajuste del ciclo al número de ondas foliculares durante el mismo; es así como en ganado lechero se ha detectado un promedio de 18 días para el ciclo de las vacas con dos ondas, 21 días para el ciclo de

vacas con tres ondas y 24 días para vacas con cuatro ondas. Por observaciones de campo se han detectado vacas que regresan al estro en un lapso de 10 días, lo que probablemente representa ciclos de una onda. Del mismo modo, la duración de los periodos de crecimiento, dominancia y latencia del folículo dominante, varían dependiendo de la oleada del ciclo en la cual se presente (33).

Figura 1. Desarrollo folicular



Fuente: Los Autores (Figura 1)

2.2.2. Vascularización folicular

En diferentes estudios se ha observado, que en cada uno de los folículos de tamaño superior a 2,5mm de diámetro de la primera onda folicular y antes de la desviación folicular, la tasa de flujo sanguíneo (FS) en los folículos más grandes fue similar a la de sus predecesores en tamaño. Pero, inmediatamente después de la selección del folículo dominante, la tasa de folículos con FS disminuyó de forma significativa en los segundos folículos más grandes. Además, los folículos pequeños con FS detectable tuvieron diámetros mayores que aquellos con FS no detectable desde el primer día antes de la ocurrencia de la desviación folicular. Del mismo modo se ha observado en folículos preovulatorios una extensa vascularización en las paredes foliculares. Estos hallazgos sugieren que



el crecimiento folicular, la selección y la atresia están asociados a los cambios en el suministro de sangre hacia un folículo individual (34).

2.3. Biotecnologías reproductivas

Durante los últimos 60-70 años, las biotecnologías reproductivas han constituido un modelo ejemplar de innovación y transferencia de tecnología entre los centros de investigación y el productor ganadero en todo el mundo (35), la biotecnología reproductiva esta fundamentalmente orientada a aumentar la capacidad reproductiva de las hembras permitiendo un aumento en el progreso genético tomando en cuenta el aumento en la presión de selección, reducción del intervalo generacional, rápida difusión de la mejora genética y control de enfermedades (36).

2.3.1. Superovulación

Consiste en el aumento del número fisiológico de ovulaciones propias de la especie, provocado por la administración de gonadotropinas. En el bovino se considera una respuesta al tratamiento cuando se produce más de dos ovulaciones, debido a que los bovinos son monovulares es imposible la obtención de varios descendientes de manera natural en corto tiempo a partir de una hembra genéticamente superior (37).

El uso de biotecnologías embrionarias requiere el proceso denominado superovulación mediante el uso de hormonas exógenas, (38) la condición fundamental para el éxito de un programa de transferencia de embriones es una alta respuesta al tratamiento superovulatorio pero la gran variabilidad en la respuesta puede estar influenciada por factores relacionados a los tratamientos o incluso a factores asociados a las características de la dinámica folicular (39).

2.3.2. MOET

La múltiple ovulación y transferencia de embriones consiste en la estimulación del ovario de la hembra para que produzca un mayor número de óvulos, para luego de ser fecundada, ya sea natural o artificialmente, recuperar los embriones y transferirlos a hembras receptoras. MOET se ha utilizado mucho en bovinos, para aumentar el número de animales puros, acelerando el proceso genético, a



diferencia de la IA en MOET la hembra juega también un importante papel, esta producción de embriones permite utilizar a las hembras como fuente genética a multiplicar en los programas de mejoramiento, llegando a utilizarse varias veces en una misma estación pero sus desventajas por la elevada heterogeneidad en la respuesta superovulatoria repercute en el costo relativo por embrión por lo tanto MOET es una técnica que necesita más investigación bajo distintas circunstancias y razas (40).

Esta técnica es usada con mayor éxito en animales Boss indicus pues éstos son más generosos debido a un mayor número de folículos reclutados a diferencia de los animales Boss Taurus, esta diferencia también existe si comparamos a los animales Boss Taurus destinados a la producción lechera con los de producción cárnica, en la parte oriental o amazónica de nuestro país la raza Charolais es usada como base en la mejora genética con excelentes resultados a la superovulación pero en las zonas altas de la sierra ecuatoriana la base para el mejoramiento genético es la raza Holstein friesian con resultados mucho más bajos en cuanto a la superovulación.

2.3.3. PIV

La producción de embriones in vitro es una biotecnología reproductiva que impacta a los sistemas ganaderos favoreciendo el mejoramiento genético. Para el uso de esta técnica, se colectan ovocitos in vivo por medio de laparoscopia y aspiración folicular guiada por ultrasonografía, estos ovocitos son sometidos a maduración in vitro, posteriormente son fecundados y sometidos a cultivo en medios con fuentes de energía, aminoácidos y factores de crecimiento hasta que lleguen a estadios de blastocito (41).

Una de las grandes limitantes que evita la difusión masiva de esta biotecnología en nuestro medio, es el alto costo de los equipos para implementar un laboratorio (41).

2.3.4. Factores que influyen en la superovulación

Existe mucha variabilidad en la respuesta a la superovulación, la cual se ve influenciada por muchos factores como la raza, edad, la categoría, la época, los niveles de nutrición, estado inmunológico, factores individuales, en varias



repeticiones de tratamientos en un mismo individuo, utilizando mismas hormonas e idénticas dosis, la habituación del animal a los preparados gonadotropos utilizados (producción de anticuerpos) (5), también se debe tener en cuenta que la respuesta ovárica declina al aumentar la edad de los animales (42).

2.4. Diferencia entre razas

Según Motta *et al.*, (43), existen diferencias en la dinámica folicular entre razas, particularidad que se observa en el número de ondas, capacidad de secretar LH y diámetro del folículo dominante. Además, variaciones en la dinámica folicular pueden deberse a factores como la dieta, manejo, estado nutricional o época del año, porque involucran complejas interacciones neurohormonales del hipotálamo-hipófisis-ovarios. La dieta puede afectar el patrón de ondas de crecimiento folicular, debido a que una nutrición pobre está asociada a bajas concentraciones de IGF-I circulante, reduciendo el diámetro del folículo dominante de todas las ondas (44).

2.5. Hormonas que intervienen en la actividad reproductiva

2.5.1. Progesterona

Tiene una vida media corta de 22 a 36 min, esto hace que sea inútil su administración oral en la mayoría de las especies. Parte de la progesterona se une a la transcortina y los estrógenos, a una globulina específica de los esteroides sexuales, los esteroides libres se oxidan en el sistema microsómico hepático y se conjugan después, sobre todo con ácido glucorónico. Los esteroides naturales o los sintéticos se excretan principalmente por vía renal, aunque se pueden encontrar trazas en heces y leche (45). Tiene un efecto inhibitorio dependiente de la dosis en la secreción de gonadotropinas hipofisarias y cierto efecto estrogénico, anabólico y androgénico (45). Para protocolos de sincronización usamos un DIB (Dispositivo Intravaginal Bovino) impregnado de 0,5 gr de progesterona, éste dispositivo es introducido mediante una pistola que mantiene las extremidades de la T aproximadas permitiendo el ingreso de la misma sin problemas, la mucosa vaginal absorbe 0,5 – 0,6 mg de P4 al día, permitiéndonos una liberación lenta durante los 7 días de sincronización (46).



Al usar progesterona en combinación con estrógenos, bloqueamos el ciclo sexual provocando el reclutamiento y maduración folicular (47), de esta forma sincronizamos la onda folicular

2.5.2. Prostaglandina F2 α (Cloprostenol)

El cloprostenol es una prostaglandina sintética análoga (48). La Prostaglandina F2 alfa o sus análogos actúan en muchos tejidos del organismo reconociéndose que en el ovario no solamente reduce el flujo sanguíneo, limitando así la funcionalidad del cuerpo amarillo también interrumpe la síntesis de hormonas ó esteroidogénesis, produciéndose así la destrucción funcional del mismo (49), es uno de los primeros análogos sintéticos de las prostaglandinas que se utilizó en terapéutica y tecnología de producción veterinaria con dosis de 0,50 mg/animal (50).

Farmacocinética del cloprostenol

Si la prostaglandina pasara del endometrio a la circulación sistémica, se inactiva al transitar por los pulmones, el bazo y el hígado, y por lo tanto llegaría en cantidades insuficientes al ovario, esta dificultad se evitaría con el mecanismo contra corriente, en donde la PGF2 α pasa del endometrio a la vena uterina y de ésta a la arteria útero ovárica que corre paralela a la vena en una sección, por medio de gradientes de concentración, alcanzando su nivel plasmático máximo una hora después de su aplicación y se elimina por completo en seis horas, su eliminación se realiza 6 horas después a través de la orina (45).

Cuando la prostaglandina es inyectada en una novilla entre el día 5 y 17 del ciclo, el cuerpo lúteo va a regresar y la mayoría de animales presentan celo en 2 a 5 días (51).

Por ser un fosfolípido de alto peso molecular se recomienda su aplicación solo por vía parenteral intramuscular, en dosis de 500 ug por animal, el fabricante menciona que ante una dosis de 50 y 100 veces la recomendada, las vacas pueden demostrar signos de malestar, saliva espumosa en la boca y disminución de la bajada de la leche (52).



Farmacodinamia del cloprostenol

Todos los análogos de la PGF2 alfa son poderosos agentes luteolíticos, causan una rápida involución del cuerpo lúteo y detienen su actividad secretoria. También tienen un efecto estimulante directo sobre la musculatura lisa del útero causando su contracción y en un efecto relajante sobre el cérvix, en animales que ciclan normalmente el estro ocurrirá en la mayoría de los casos 2 a 5 días después del tratamiento y en bovinos preñados tratados entre los días 10 y 150 de la gestación, el aborto se producirá 2 – 3 días después de la inyección (52).

2.5.3. Benzoato de estradiol

Los estrógenos exógenos como el BE administrados en la fase de elevados niveles de progesterona inducen la regresión de un posible cuerpo lúteo en formación ya que los estrógenos son potentes agentes antiluteotróficos en los primeros días del ciclo y al mismo tiempo provoca la atresia del folículo dominante de la onda folicular en curso independientemente de la fase en la que éste se encuentre (24), e induce la emergencia de una onda folicular sincrónica mientras que la administración en la fase de bajos niveles de progesterona induce liberación de LH y la ovulación (53). En la década del 90 se desarrollaron tratamiento con progestágenos y estradiol, que inducen a la atresia de todos los folículos y el comienzo de una onda folicular 4 días después (8).

Farmacodinamia del Benzoato de estradiol

El benzoato de estradiol (BE) en dosis de 2,5 mg (54) suprime el desarrollo del folículo antral (55), y dicha supresión es mayor cuando se da después de la inserción de un implante de progesterona (56). Los estrógenos tienen acciones sobre distintos órganos blanco, como las Cuernos uterinos, el útero, la vagina, la vulva y el sistema nervioso central. A nivel uterino, actúan como hormonas tróficas provocando la proliferación de células y glándulas endometriales; que aumentan su secreción, el uso exógeno de estradiol en el control del ciclo sexual tiene como objetivo desencadenar la luteólisis, cuando es aplicado en la mitad del ciclo o impedir el crecimiento de un nuevo cuerpo lúteo cuando es aplicado



luego de la ovulación. Así mismo al ser aplicado al momento de la aplicación de progestágenos suprime la onda folicular presente e induce el desarrollo de una nueva onda folicular (57).

En el sistema nervioso central los estrógenos naturales estimulan la conducta de celo y en el hipotálamo ejercen un "feed back" negativo sobre el centro tónico y positivo sobre el centro cíclico (57), afectando la liberación de gonadotropinas desde la pituitaria (52).

Farmacocinética del benzoato de estradiol

El BE es un derivado sintético de 17β Estradiol, hormona esteroidea sintetizada por el folículo ovárico (58), es menos polar que el estradiol ya que no presenta la mayor parte de los electrones en un extremo esto le permite una absorción más lenta y una duración de acción más prolongada, permaneciendo su efecto por varios días. Estos ésteres son absorbidos y subsecuentemente hidrolizados hacia el componente activo estradiol, la mayoría está unido a la globulina fijadora de hormonas sexuales (SHBG), y también a la albúmina. Sólo una fracción del 2,21% (+/- 0,04%) es libre y biológicamente activo (45). La desactivación incluye la conversión hacia un estrógeno menos activo, como la estrona y estriol. El estriol es el principal metabolito urinario. El estradiol es conjugado en el hígado por la formación de sulfato y glucurónido y, como tal, excretado a través de los riñones (52).

En el sistema nervioso central los estrógenos naturales estimulan la conducta de celo y en el hipotálamo ejercen un "feed back" negativo sobre el centro tónico y positivo sobre el centro cíclico (57), afectando la liberación de gonadotropinas desde la pituitaria (52).

2.5.4. Gonadorelina (análogo de la GnRH)

Los agonistas de la GnRH son sustancias con mayor afinidad que la GnRH endógena por sus propios receptores en la adenohipofisis, y a los cuales permanecen unidos más tiempo, estimulando su actividad fisiológica (59).



Farmacodinamia de la gonadorelina

La GnRH actúa sobre receptores específicos de la adenohipofisis estimulando la liberación de FSH y LH, la FSH actúa sobre las células foliculares en el ovario estimulando la producción de estrógenos y el crecimiento y desarrollo del folículo, en respuesta a la LH desaparece el folículo dominante de la onda folicular en curso ya sea por ovulación y formación de un nuevo cuerpo lúteo o atresia (24). Independientemente de la presencia o no del cuerpo lúteo, desarrollándose una nueva onda folicular (60). 2 o 3 días más tarde (61).

Farmacocinética de la gonadorelina

Tienen una vida media prolongada, lo que los hace más potente que la GnRH endógena (62). La gonadorelina en dosis de 250 µg (63) incrementa las concentraciones plasmáticas de la FSH y LH tiene una duración que varía entre seis y 28 horas (45).

2.5.5. Hormona folículo estimulante (FSH)

En los estadios antrales, la FSH es necesaria para promover el crecimiento folicular, ya que promueve la proliferación de las células de la granulosa (64). Permitiendo el desarrollo de los folículos de 4 mm a 9 mm en las hembras bovinas (65). Impidiendo así la atresia folicular (66).

El pico de FSH plasmático está asociado con el día del surgimiento de la onda folicular (67). Cuando dicha concentración incrementa de 1,5 a 2 veces la concentración basa (20). En vacas se ha reportado picos de FSH de hasta 6ng/ml (68). En bovinos, dicho pico se presenta aproximadamente de 12 a 24 horas antes de la emergencia de la onda (67). Teniendo en cuenta que en rumiantes se presentan múltiples ondas foliculares, se observa que las concentraciones basales de FSH que preceden a los picos relacionados con la onda ovulatoria son más altas que en las anovulatorias (69). Durante el periodo interovulatorio, se reportan concentraciones basales de la FSH en bovinos *Bos indicus* de 0,2 – 0,8 ng/ml (70), y en *Bos Taurus* de 0,2 – 3 ng/ml (68).



Dos días después del surgimiento de la onda folicular, decrece la concentración sanguínea de FSH y comienza la desviación folicular (71). Cuando el folículo dominante adquiere un diámetro de 8 a 10 mm en vacas (68). Puede expresar receptores de LH en las células de la granulosa y de la teca, y además, inicia la producción de inhibina y E2 entre otros factores intrafoliculares (72). En este momento cuando se transfiere la dependencia gonadotrópica del folículo de la FSH a la LH (65), (72).

2.6. Ablación folicular

Es un proceso mecánico que consiste en la aspiración de los folículos de los ovarios de una vaca viva mediante ultrasonografía a través de la pared vaginal provocando el comienzo sincrónico de una nueva onda folicular 1,5 días después (23), para usar esta técnica se requiere de un equipo de ultrasonografía, un transductor sectorial, una bomba de aspiración y un sistema de guía de la aguja (73).

2.7. Ultrasonografía

En los últimos años, numerosos trabajos se han efectuado en el área de fisiología reproductiva de la hembra en varias especies de interés zootécnico, con el fin de dilucidar aún más en aquellos fenómenos fisiológicos que todavía permanecen confusos (74). En apoyo a dichas investigaciones han sido aplicadas novedosas tecnologías, destacándose entre ellas la ultrasonografía, la cual tiene cada día un mayor empleo en el diagnóstico reproductivo de los bovinos (75).

La ultrasonografía (USG), representa una valiosa herramienta para estudiar y evaluar los órganos del tracto reproductivo de la vaca (76). Su empleo ha estado más orientado al estudio fisiológico de la dinámica folicular ovárica (77), actividad luteal (78), e involución uterina (79). También ha tenido amplia aplicación en la evaluación del desarrollo de la gestación (80), determinación de la viabilidad y sexo fetal (81), así como en el diagnóstico de las alteraciones reproductivas, tales como quistes ováricos, metritis y momificación fetal (82).

Para la ultrasonografía ovárica, se explora primero el ovario derecho y luego el izquierdo con un barrido en ubicación dorso-ventral, lateral-medial y medial-



lateral (75). Para determinar el tamaño de las estructuras se utiliza el promedio de dos medidas en milímetros del ancho por el alto (83).

2.8. Extracción y análisis de sangre

Para todas las muestras sanguíneas, es necesario separar el suero o plasma de la sangre total tan pronto como sea posible. Esto minimiza el riesgo de hemólisis. Aunque ha habido estudios sobre estabilidad de hormonas en sangre en humanos existe poca investigación sobre la estabilidad de hormonas de origen animal. Ciertas hormonas que son muy estables en humanos no lo son en animales. La sangre hemolizada no afecta los niveles sanguíneos de estradiol en muestras de perros y otros animales domésticos, sin embargo la sangre no hemolizada proveniente de rumiantes metaboliza progesterona rápidamente pero no afecta el nivel de cortisol (84).

Para la colección de sangre debe tenerse en cuenta el sitio de punción y el calibre de aguja a utilizar para cada especie. Siempre utilizar aguja y tubo vacutainer, no jeringuilla ya que esta propicia que se dañe la muestra por hemólisis y además presenta un alto riesgo de bioseguridad para las personas que las transportan o las manejan en el laboratorio. Al momento de tomar la muestra debemos tomar en cuenta lo siguiente:

- No colocar el bisel de la aguja hacia abajo pues imposibilita el paso de sangre.
- No usar agujas húmedas ya que se hemolizan los glóbulos rojos.
- Utilizar siempre aguja y tubo vacutainer individual por cada animal (85).

2.8.1. Toma de muestra de sangre de la vena yugular

Es un sitio muy común y accesible para la obtención de sangre venosa, requiere una mayor sujeción de la cabeza para evitar accidentes. La vena yugular externa pasa a lo largo del cuello. Se forma caudal a la glándula parótida, está alojada en el surco yugular, formado por los músculos cleidomastoideo y esternomandibular. Es una vena voluminosa, palpable y visible, se la puede hacer más visible si se comprime en la base del cuello. Se recomienda obtener las muestras de sangre en el tercio craneal o medio siguiendo los siguientes pasos:



1. Rotular e identificar el tubo.
2. Sujetar la cabeza en un brete o corral con la ayuda de lasos.
3. Localizar la vena en el surco yugular, en los animales que no se observa a simple vista es fácilmente palpable.
4. Colocarse los guantes.
5. Realizar antisepsia con alcohol 70% o con yodo povidona al 10%, en una zona de piel unos 10 cm de diámetro alrededor del sitio de punción. Se recomienda por el centro y se irán haciendo círculos concéntricos hacia el exterior. Dejar actuar 1-2 minutos.
6. Desinfectar el tapón de goma del tubo con alcohol 70%.
7. Empatar la aguja en el capuchón.
8. Encajar el tubo en el capuchón sin perforarlo.
9. Insertar la aguja en la vena con un ángulo de 30°
10. Estabilizar el capuchón y la aguja con la mano y forzar el tapón de goma en el tubo para introducir la aguja y así la sangre fluirá dentro del mismo.
11. Mantener el capuchón estable hasta que consumir todo el vacío y retirar el tubo.
12. Retirar la aguja y ejercer presión sobre la zona de punción con gasa por unos segundos.
13. Desechar la aguja en el guardián, y el resto de materiales contaminados en la bolsa roja (86).

2.8.2. Electroquimioluminiscencia

Es un inmunoensayo con un proceso en el que una molécula de alta energía es excitada químicamente y se descompone liberando su energía en forma de luz. La energía requerida para la emisión de luz es generada por la oxidación de un substrato específico, la enzima utilizada rompe el éster de fosfato produciendo un anión inestable que se descompone acompañado por la emisión de luz.

Este método de inmunoanálisis presenta un futuro inmediato en la práctica clínica habitual, por presentar:

- Alta sensibilidad.



UNIVERSIDAD DE CUENCA

- No emplea radioactividad.
- No genera riesgo contaminante ni ruido de fondo a la hora de efectuar el proceso de análisis de una muestra, control o estándar.
- Los resultados son rápidos.
- Equipos automatizados de fácil manejo (87).



3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Materiales

3.1.1. Físicos

- Agujas vacutainer
- Agujas descartables 18 G
- Ecógrafo Mindray Mod: DP-6600Vet
- Transductor lineal
- Porta sonda de ultrasonido
- Transductor sectorial
- Bomba de aspiración
- Sistema de guía de aguja con aguja larga desechable 20GSet de mangueras
- Tubos vacutainer de tapa roja con gel
- Holder(capuchón)
- Pipetas automáticas
- Centrífuga
- Tubos de ensayo
- Tubos eppendorf

3.1.2. Biológicos

- Hormonas: GnRH, benzoato de estradiol
- Vaconas
- Muestras de sangre

3.1.3. Químicos

- Alcohol 70%
- Xilacina 2%
- Lidocaína 2%
- Yodo 10%
- Amonio cuaternario
- Gel desinfectante



3.2. Métodos

3.2.1. Área de estudio

La investigación se llevó a cabo en la Granja experimental “Nero”, de la Universidad de Cuenca ubicada en la Provincia del Azuay, cantón Cuenca, Parroquia Baños, Sector Nero (2°57'32.4"S 79°06'13.2"W), que se encuentra a una altitud de 3.100 m.s.n.m. con una temperatura promedio de 8 °C y una pluviosidad que varía de 500-1000 mm anuales según la Estación Meteorológica de la Universidad de Cuenca, zona netamente ganadera por las condiciones topográficas y climatológicas en las que se encuentra (88).

3.2.2 Características de la unidad de análisis

En esta investigación se seleccionaron 9 vaconas de fenotipo Holstein mestizas, entre 15 y 18 meses de edad, clínicamente sanas, éstos datos fueron constatados con los historia clínica y reproductiva que existe en la granja, todos los animales tuvieron un peso mayor a 300 kg, y una CC de 3 en una escala del 1 al 5, alimentadas con una dieta basal (pastoreo 90%, concentrado 8% y premezcla mineral 2%).

3.3. Metodología

Este experimento buscó determinar la eficacia de la GnRH, el Benzoato de estradiol (BE), y la ablación folicular, para sincronizar el reinicio de una nueva onda folicular post-tratamiento.

3.3.1. Sincronización previa al tratamiento

Para que las nueve vaconas se encuentren en un mismo día del ciclo estral se realizó una sincronización previa con el siguiente protocolo:

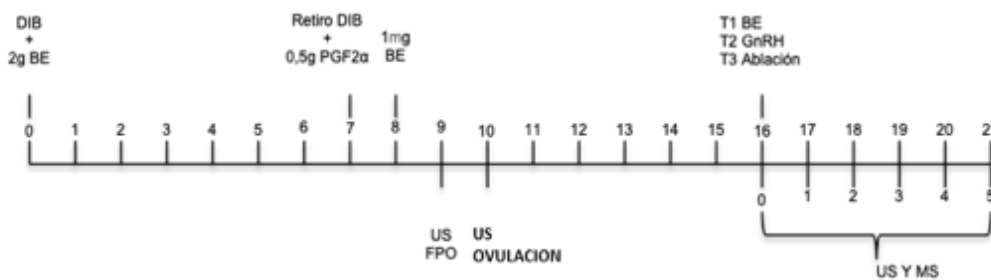
- Día 0= Dispositivo intravaginal de liberación de progesterona (0,5 gr P4) y 2 mg de benzoato de estradiol IM
- Día 7= Retiro del dispositivo intravaginal y PGF2 α , 0,50 mg IM
- Día 8= Benzoato de estradiol 1mg IM

56 horas luego de la remoción del dispositivo intravaginal se evaluó mediante ecografía la presencia de FPO (Folículo pre ovulatorio), al siguiente día de igual



manera se confirmó la ovulación y finalmente en el día 6 post-ovulación se realizó un mapeo de los ovarios (Derecho e izquierdo), con la finalidad de determinar la presencia de cuerpo lúteo (CL >16 mm) y folículo dominante (FD >10 mm) y así se comenzó con la aplicación de los tratamientos, (figura 2).

Figura 2. Protocolo de sincronización del ciclo estral y aplicación de los tratamientos.



Fuente: Los Autores (Figura 2)

3.3.2. Protocolos para reiniciar la onda

Tratamiento 1.- Día -0: Benzoato de Estradiol 2,5 mg IM.

Tratamiento 2.- Día -0: GnRH 250 ug IM.

Tratamiento 3.- Día -0: Ablación de los folículos >5mm

3.3.3. Inicio de los tratamientos

Luego de confirmar la presencia de estas dos estructuras, se aplicaron los diferentes tratamientos. T1 (n=3) Benzoato de estradiol 2,5 mg IM. T2 (n=3) GnRH 250 ug IM. T3 (n=3) ablación de los folículos >5mm.

El día 6 post confirmación de la ovulación se tomó como día cero y empezaron los tratamientos realizándose las siguientes actividades.

- 1) Valoración del proceso de atresia u ovulación del folículo dominante (FD >10mm), y el crecimiento de la nueva onda folicular (se contaron los folículos >4mm presentes en los ovarios), mediante ultrasonografía en los tres tratamientos cada 24 horas (6am – 6am), durante 5 días.



UNIVERSIDAD DE CUENCA

- 2) Se determinaron los niveles de FSH en sangre, para lo cual se tomaron 10 ml de sangre de la vena yugular, cada 24h (6am – 6am), durante 5 días consecutivos, estas muestras fueron centrifugadas por 15 minutos a 2.500 rpm para obtener el sobrenadante o suero bovino, todas las muestras fueron rotuladas con su respectivo tratamiento, fecha e identificación del animal, y colocadas en tubos eppendorf de 1,5 ml para congelarse cada día hasta terminar el periodo, luego se llevaron todas en conjunto al laboratorio Cenbiocli S. A. para su respectivo análisis.
- 3) Terminado el primer periodo se aplicó una sincronización del ciclo sexual, usando PGF₂, de esta manera las vaconas tuvieron 10 días de descanso para que todas presenten un cuerpo lúteo funcional, entonces los tratamientos fueron alternados, de igual manera para el último periodo hasta cumplir las tres repeticiones en los tres periodos y finalmente relacionar los picos de FSH con la aparición de la nueva onda folicular mediante ecografía. Se llevaron a cabo 135 debido a que ya se confirmó el reinicio de la onda en todos los tratamientos hasta el día 4 mediante ecografía y el pico de FSH se produce 24 horas previas al mismo.

3.3.4. Diseño experimental

Se utilizó un diseño experimental de cuadrado latino de 3x3. Con tres tratamientos y tres repeticiones.

- Tratamiento 1: con benzoato de estradiol
- Tratamiento 2: con GnRH
- Tratamiento 3: con ablación folicular



Primera repetición

# animal periodo	Vaca # 1	Vaca # 2	Vaca # 3
1er periodo	1	2	3
2do periodo	2	3	1
3er periodo	3	1	2

Segunda repetición

# animal periodo	Vaca # 4	Vaca # 5	Vaca # 6
1er periodo	1	2	3
2do periodo	2	3	1
3er periodo	3	1	2

Tercera repetición

# animal periodo	Vaca # 7	Vaca # 8	Vaca # 9
1er periodo	1	2	3
2do periodo	2	3	1
3er periodo	3	1	2



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Para el análisis estadístico se utilizó el programa SPSS versión 24, obteniéndose estadígrafos principales. Se realizó un ANOVA para el análisis de varianzas y para la prueba de subconjuntos homogéneos se ejecutó la prueba de Duncan al 5%.

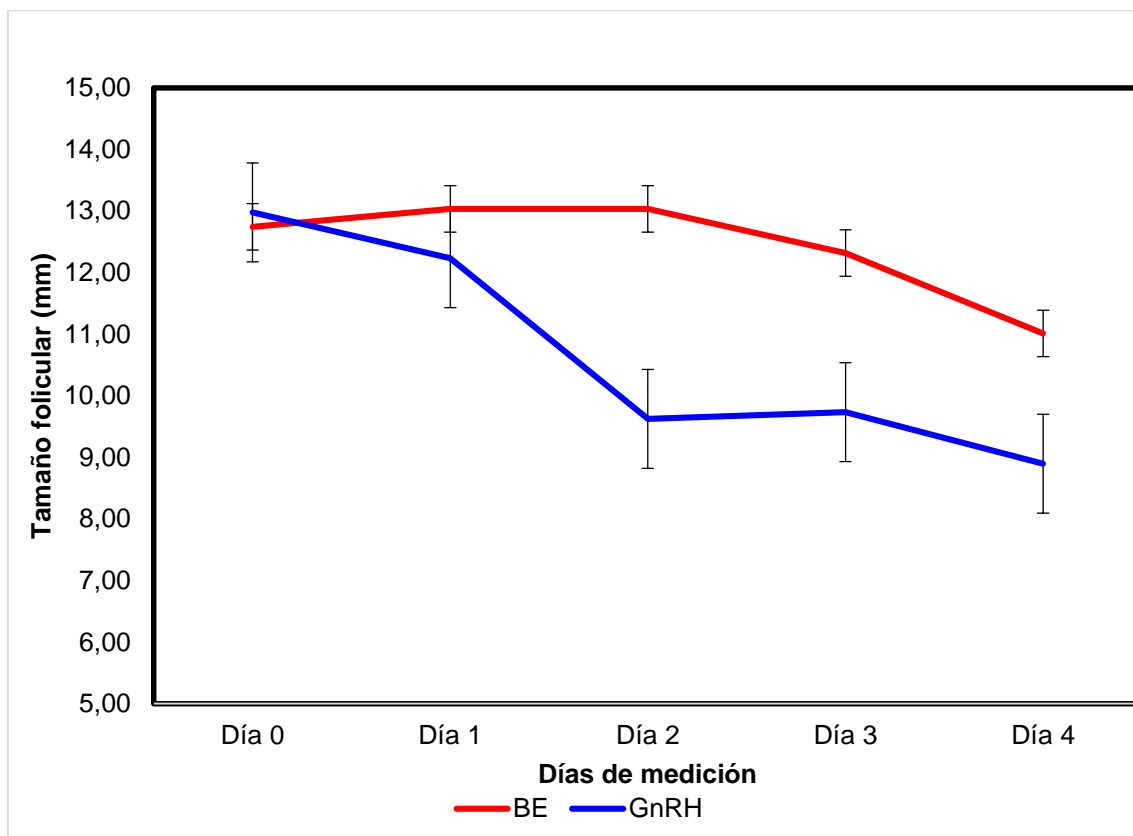
4. RESULTADOS

Al día 4 post aplicación de todos los tratamientos ya se cumplió con los objetivos planteados tanto para los picos de FSH como para la aparición de la nueva onda folicular e incluso se determinó que el comportamiento del folículo dominante fue igual en los dos tratamientos farmacológicos, produciéndose atresia del mismo en todos los periodos y en la totalidad de las unidades experimentales, por lo tanto, se redujeron las tomas de muestra de sangre a 135 tubos eppendorf con suero bovino.

4.1. Comportamiento del folículo dominante

Durante el desarrollo del experimento se observó la atresia del folículo dominante en el grupo al que se le administró GnRH, pero aquellos tratados con benzoato de estradiol se mantuvieron hasta el día 2 y posterior a este comenzaron con el proceso de atresia, como se observa en la figura 3. En ninguno de los dos tratamientos farmacológicos existió ovulación.

Figura 3. Valores promedios del comportamiento del folículo dominante.





4.2. Niveles séricos de FSH

Al observar los valores promedios de los niveles de FSH (ng/dl) de los tres tratamientos, se obtuvo valores más altos para el tratamiento con Benzoato de Estradiol, (tabla 1). En el análisis estadístico los datos de pico de FSH y día de reinicio de la nueva onda cumplieron con los supuestos de normalidad según la prueba estadística de Shapiro-Wilk. (Anexo 1).

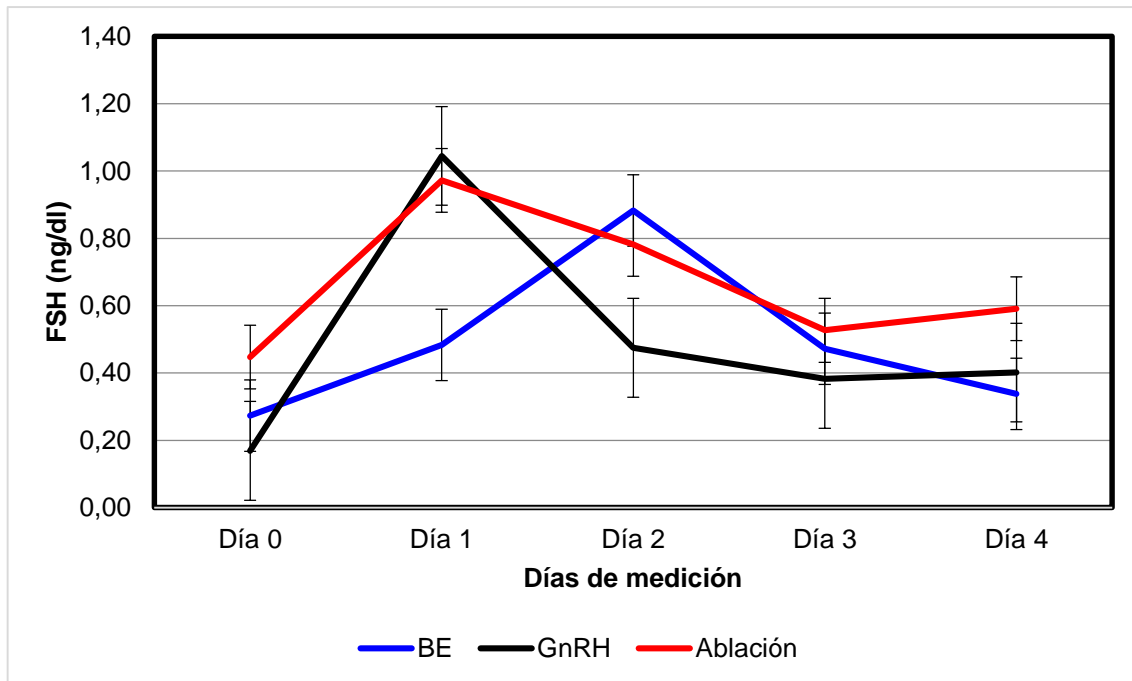
Tabla 1. Valores estadísticos descriptivos de los niveles de FSH en ng/dl.

Tratamiento	Media	Error estándar	Intervalo de confianza al 95%	
			Límite inferior	Límite superior
BE	1,889	0,302	1,241	2,537
GnRH	1,222	0,302	0,574	1,87
Ablación	1,222	0,255	0,674	1,77

No muestran diferencia estadísticamente significativa ($p > 0,05$) según la prueba de Breusch-Pagan modificado.

Durante la evaluación de los niveles diarios de FSH (figura 4) podemos observar que existe un patrón similar entre el tratamiento farmacológico con GnRH y el tratamiento mecánico mediante ablación folicular, no existiendo diferencia significativa entre ellos, pero si en comparación con el tratamiento con BE ($p > 0,05$).

Figura 4. Valores promedio de los niveles de FSH durante el experimento.



4.3. Día de reinicio de la onda folicular mediante ecografía

El reinicio de la onda folicular mediante GnRH fue en promedio el día 2,44, para el tratamiento con Benzoato de Estradiol fue el día 3,22 y finalmente para el tratamiento mecánico mediante ablación folicular fue en el día 2,00 post aplicación de los mismos, (tabla 2).

Tabla 2. Valores estadísticos descriptivos del día de reinicio de la onda folicular mediante ecografía.

Tratamiento	Media	Error estándar	Intervalo de confianza al 95%	
			Límite inferior	Límite superior
BE	3,2222 a	0,14699	2,8833	3,5612
GnRH	2,4444 b	0,17568	2,0393	2,8496
Ablación	2,0000 c	0,16667	1,6157	2,3843

Literales diferentes indican diferencia estadística con la prueba de Duncan ($p < 0,05$).



Luego de analizar los valores promedio en la (Tabla 2), de los días de reinicio de la onda folicular mediante ecografía se determinó una diferencia estadística significativa entre ellos con la prueba de Duncan ($p < 0,05$).

4.4. Número de folículos en el reinicio de la onda

Se comprobó que no existe diferencia significativa mediante el test de Breusch-Pagan (Tabla 4), los diferentes tratamientos, los diferentes periodos y los diferentes animales utilizados no influyeron en el número de folículos presentes en el reinicio de la onda.

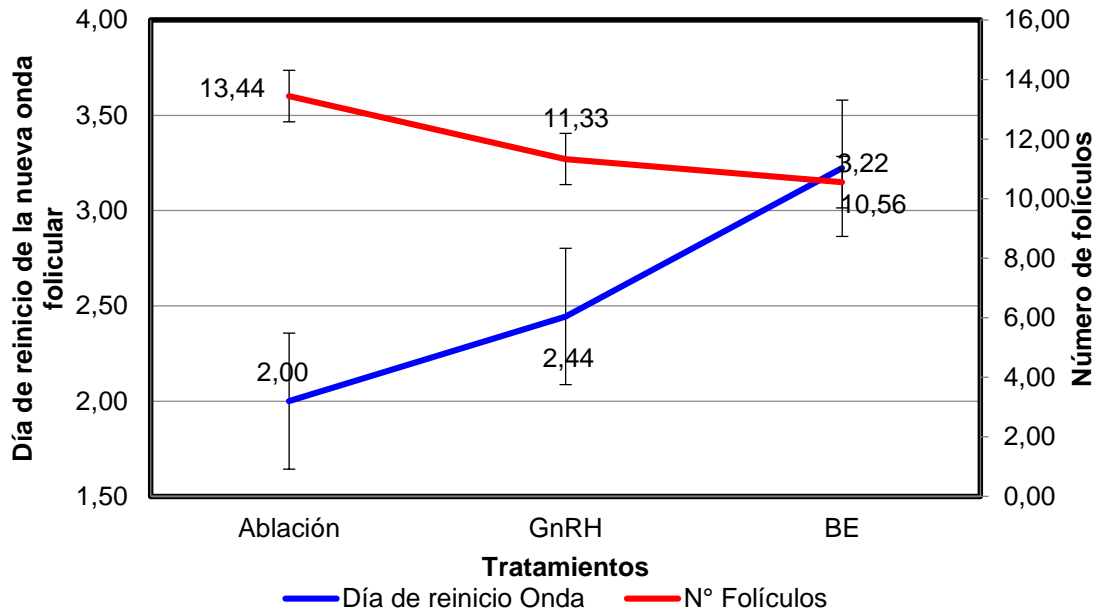
Tabla 3. Test de Breusch-Pagan modificado para heterocedasticidad a,b,c.

Origen	Tipo III de suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	304,400 ^a	12	25,367	2,813	0,034
Intersección	3745,333	1	3745,333	415,269	0
TTO	42,4	2	21,2	2,351	0,132
VACA	204,667	6	34,111	3,782	0,019
PERIODO	24,667	2	12,333	1,367	0,287

Prueba la hipótesis nula de que la varianza de los errores en el número de folículos no depende de los valores de las variables independientes.

Los valores promedio del número de folículos presentes en el reinicio de la onda fueron de 13,44 para ablación del folículo dominante, 11,33 para el tratamiento con GnRH y finalmente 10,56 para el tratamiento con benzoato de estradiol, (figura 5).

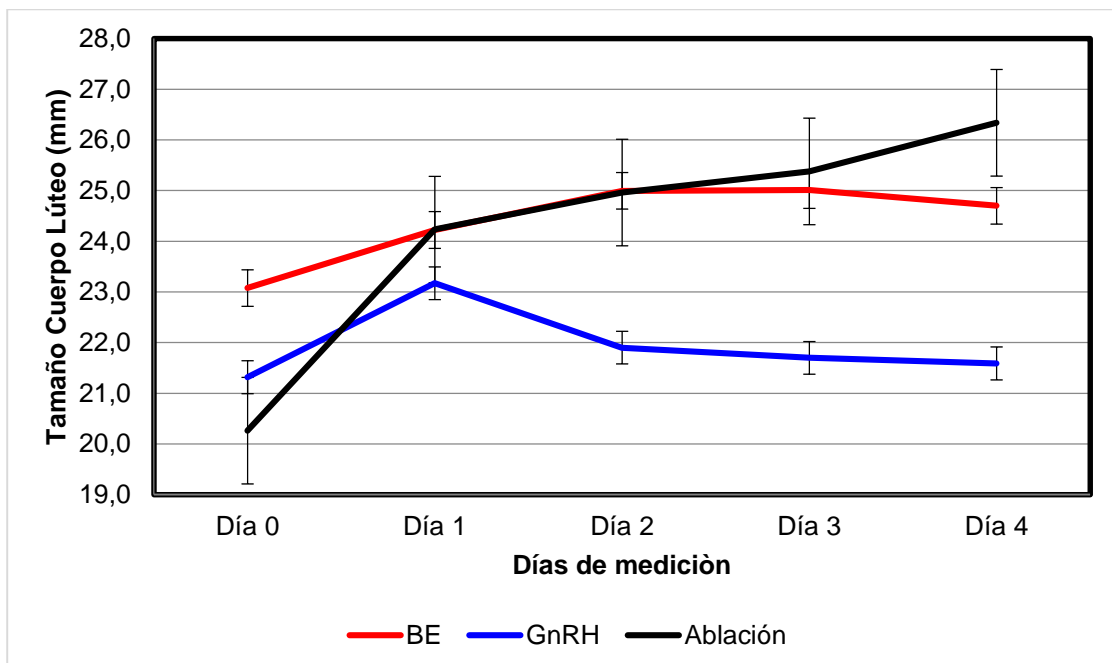
Figura 5. Valores promedio del día de reinicio de la onda folicular y el número de folículos por tratamiento.



4.5. Comportamiento del cuerpo lúteo

Durante todo el experimento el cuerpo lúteo de todas las vaconas se mantuvo funcional ya que siempre fue mayor de 21 mm como se indica en la figura 6.

Figura 6. Valores promedios del comportamiento del cuerpo lúteo.





5. DISCUSIÓN

Las diferentes condiciones de manejo, alimentación, raza e incluso el medio como la altitud en el que se desarrollan las distintas ganaderías tanto para carne como para leche pueden influir en el desarrollo reproductivo como en el comportamiento folicular de los animales, por esta razón es de suma importancia conocer a profundidad el comportamiento de nuestros animales frente a las diferentes hormonas presentes en el mercado y así optimizar la aplicación de biotecnologías reproductivas.

En la investigación realizada por Fernández se confirma la ovulación del folículo dominante cuando se usa GnRH para provocar el reinicio de la nueva onda folicular dependiendo de su etapa de desarrollo (24) a diferencia de nuestra investigación en la cual todos los folículos dominantes sufrieron atresia debido a los elevados niveles de progesterona. Esta diferencia se debe a que en nuestro experimento se realizó cuando todas las vaconas se encontraban en fase luteal. De igual manera para protocolos con benzoato de estradiol indistintamente de la etapa de desarrollo folicular existe atresia del folículo dominante según la literatura consultada de autores como Bó, Tribulo y Mapletoft, esta afirmación concuerda con esta investigación (8).

Autores como Franco y Uribe, (20) corroboran que existe un pico previo de FSH 12 a 24 horas antes del reinicio de la nueva onda folicular, en esta investigación este pico se mantuvo dentro de ese promedio.

Primer tratamiento, benzoato de estradiol

En la actualidad muchos países como EEUU, Nueva Zelanda y los de la unión Europea han restringido el uso de esteres de estradiol para la producción de ganado de carne pero esta medida también afecta al uso del estradiol en programas reproductivos, tanto de sincronización como de superovulación, pese a que en 1988 el comité de expertos sobre Aditivos alimentarios de la Organización de Alimentos y Agricultura (FAO), y de la organización mundial de la salud (OMS), la Administración de Drogas y Medicamentos (FDA) explicó que



los residuos presentes en la carne de animales tratados con hormonas sexuales no representan ningún riesgo para el consumo humano (96). Por lo tanto, su uso para programas reproductivos es seguro e ideal ya que en esta investigación existió una menor variabilidad en los resultados obtenidos con el uso de benzoato de estradiol.

Se conoce que la administración de 2,5mg de BE provoca la emergencia de la onda folicular 4 días después con poca variabilidad en estudios realizados por Bó *et al.*, (53). De forma similar en un estudio realizado por Burke *et al.*, (89) en vaquillas con diferentes dosis de BE se encontró que con la aplicación de 2mg IM el reinicio de la nueva onda folicular ocurre 4 días después. En esta investigación tras la aplicación de 2,5 mg IM de BE el reinicio de la nueva onda folicular ocurrió a los 3 días post tratamiento

Segundo tratamiento, GnRH

Varios estudios realizados por Espinoza M, Suarez *et al.*, y Twagiramungu *et al.*,(61), (90), (91), demuestran que los protocolos de superovulación usados con GnRH provocan un reinicio de la onda folicular 2 o 3 días más tarde en este experimento el reinicio se evidenció a los 2,33 días, manteniéndose en este promedio, no así Martínez *et al.*, (92) quienes en un estudio para caracterizar la dinámica folicular ovárica en novillas concluyen que el reinicio de onda se produce 1,3 días post aplicación de GnRH y que solo se sincronizan cuando existe ovulación del folículo dominante. Las primeras investigaciones en ganado lechero se llevaron a cabo con animales que no contaban con una pre sincronización del ciclo estral, por ende existió una ovulación del 85% según Pursley *et al.*, en 1995 (11). Una investigación similar pero más actual realizada por Colazo *et al.*, en el 2007 reportó que con GnRH solo obtuvo una ovulación del 44,3% (8). En esta investigación no existió ovulación por la presencia de un cuerpo luteo funcional obteniéndose una alta variabilidad en los datos, podemos afirmar que la eficacia de los tratamientos con GnRH depende de la fase del ciclo sexual y en este caso los animales deben ser sincronizados para que todos se encuentren en fase folicular.



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Estudios similares de superovulación en Canadá realizados por Kohram *et al.*, utilizando vacas Holstein, evaluó el tiempo de reinicio de la nueva onda folicular en dos periodos distintos del ciclo estral (día 4 al 7 y día 15 al 18), concluyendo que la nueva onda reinicia 3 a 4 días post aplicación de GnRH independientemente del día del ciclo estral en el que estén las vacas (93).

Tercer tratamiento, ablación folicular

Según la literatura consultada, Fernández *et al.*, al realizar la ablación de los folículos de 5mm constató que se provoca un reinicio de la nueva onda folicular 1,5 días post realización del mismo (24), diferente a lo observado en este estudio, donde se verificó el reinicio a los 2 días, resultados similares han sido reportados por Bergfelt *et al.*, en vaquillas nulíparas después del uso de procedimientos de ablación dando lugar a la aparición de la nueva onda folicular 2 días después (94).



6. CONCLUSIONES

En esta investigación el tiempo de reinicio de la nueva onda folicular difiere estadísticamente entre los tratamientos benzoato de estradiol, GnRH y ablación folicular.

En los dos tratamientos farmacológicos Benzoato de Estradiol y GnRH se evidencio la atresia del folículo dominante.

Con el tipo de manejo, nutrición y condiciones medioambientales presentes en este estudio, el pico de FSH se efectuó 24 horas previas al reinicio de la onda folicular.

No existe ovulación del folículo dominante cuando se utiliza GnRH siempre y cuando los animales se encuentren en fase luteal.

El uso de ablación folicular es tan efectivo como el benzoato de estradiol para inducir el reinicio de una nueva onda folicular, pero requiere de un equipo más complejo, personal capacitado y necesita de una sedación previa del animal junto a una anestesia epidural.



7. RECOMENDACIONES

En programas de MOET O FIV se debe considerar la ablacion folicular siempre que se requiera acortar el número de días del protocolo a usarse, pues la ablación permite un reinicio de la onda folicular en tan solo dos días y con poca variabilidad.

Se recomienda continuar esta investigación hasta evaluar la calidad de ovocitos recolectados, debido a que este trabajo solo llegó hasta cantidad de foliculos presentes en la fase de reclutamiento.

Para futuras investigaciones se recomienda analizar los mismos tratamientos en fase folicular, puesto que en este trabajo se realizó en fase luteal.



8. BIBLIOGRAFÍA

1. Quispe C, Mercado J, Mixan E, Gamarra S, Mellisho E. a SPRA (Ovum pick up) GUIADA POR ULTRASONIDO EN VACAS LECHERAS Effect of treatment with estradiol benzoate ó GnRh on dynamic follicular for suction follicles (ovum pick up) guided by ultrasound in dairy cows. 2014;4(1):86-8.
2. Bo GA. Dinámica Folicular Y Tratamientos Hormonales Para Sincronizar La Ovulacion En El Ganado Bovino. XI Congr Venez Prod e Ind Anim. 2002;1-17.
3. Díaz T. Dynamics of the Ovarian Follicular Development During The Estrous. Fac Ciencias Vet Univ Cent Venez. 1999;40(1):3-18.
4. Ruiz S, Romero-Aguirregomezcorta J, Astiz S, Peinado B, Almela L, Poto A. Application of reproductive biotechnology for the recovery of endangered breeds: Birth of the first calf of murciana-levantina bovine breed derived by opu, in vitro production and embryo vitrification. Reprod Domest Anim. 2013;48(6).
5. Córdova A. Protocolos de sincronización y superovulación para transferencia de embriones en bovinos. [Internet]. UNIVERSIDAD DE CUENCA; 2011. Recuperado a partir de: <http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/3050/1/mv167.pdf>
6. Garzón N, Urrego R, Giraldo A. Some factors affecting superovulation treatments in cattle embryo transference. 2007; Recuperado a partir de: <http://revistas.ces.edu.co/index.php/mvz/article/viewFile/381/1883>
7. Becaluba F. Factores que afectan la superovulación en bovino [Internet]. 2007. p. 1-18. Recuperado a partir de: http://www.produccion-animal.com.ar/informacion_tecnica/transplante_embrionario/17-superovulacion.pdf
8. Bó GA, Tríbulo A, Mapletoft., Reuben J. Nuevos protocolos de superovulación para programas de transferencia de embriones en bovinos. 2011;1:26-33. Recuperado a partir de: <http://www.reproduccionanimal.org/site3/files/revistas/spermova1/NUEVO>



S-PROTOSCOLOS-DE-SUPEROVULACIN-PARA-BOVINObo2011-26-33.pdf

9. Henao G. Algunos Factores Relacionados con la Dinámica Folicular en. Vol. 63. 2010. p. 5577-86.
10. Berfelt. Ovarian synchronization following ultrasound-guided transvaginal follicle ablation in heifers. *Theriogenology*. 1994;42(6):895-907.
11. Pursley J, Mee M, Wiltbank M. Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF2a and GnRH. *Theriogenology*. 1995;44:915-23.
12. Dorneles R, Paula G De, Rocha M, Cristine P, Silva P, Padilha J, et al. *Theriogenology* Characterizing emergence and divergence in the first follicular wave in a tropically adapted *Bos taurus* breed. *Theriogenology* [Internet]. Elsevier Inc; 2017;88:9-17. Recuperado a partir de: <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.09.041>
13. Prieto B, Velázquez M. Fisiología de la reproducción: hormona liberadora de gonadotropinas [Internet]. Vol. 45. 2002. Recuperado a partir de: <http://www.ejournal.unam.mx/rfm/no45-6/RFM45605.pdf>
14. Colazo MG, y Mapletoft RJ. Colazo, M.G. 1 y Mapletoft, R.J. 1. 2014;16:31-46.
15. Forde N, Beltman ME, Lonergan P, Diskin M, Roche JF, Crowe MA. Oestrous cycles in *Bos taurus* cattle. *Anim Reprod Sci*. Elsevier B.V.; 2011;124(3-4):163-9.
16. Díaz T. Capítulo XLIV Dinámica folicular ovárica durante el ciclo. En: Desarrollo sostenible de la ganadería doble propósito [Internet]. 2008. p. 547-52. Recuperado a partir de: http://www.avpa.ula.ve/libro_desarrollosost/pdf/capitulo_44.pdf
17. Hernández J. Fisiología clínica de la reproducción de bovinos lecheros [Internet]. 2016. 87 p. Recuperado a partir de: http://www.fmvz.unam.mx/fmvz/publicaciones/archivos/Fisiologia_Clinica.pdf
18. Sanchez M. El ciclo estral de la vaca. 1ra ed. Servet. Zaragoza; 2008.
19. Fernandez E. Producción de embriones in vivo en tres razas de ganado lechero. Universidad Nacional Agraria La Molina; 2014.



20. Franco J, Uribe L. Hormonas reproductivas de importancia veterinaria en hembras domésticas ruminantes. Biosalud. 2012;11(1):41-56.
21. Filipiak Y, Viqueira M, Bielli A. Development and follicular dynamics from fetal life until puberty in cattle Resumen Introducción. SMvU [Internet]. 2016;52:14-22. Recuperado a partir de: <http://www.revistasmvu.com.uy/component/content/article/85-revista-numero-202/356-desarrollo-y-dinamica-de-los-foliculos-ovaricos-desde-la-etapa-fetal-hasta-la-prepuberal-en-bovinos.html>
22. Pérez C, Rodríguez I, España F, Dorado J, Hidalgo M, Corral S, et al. DINÁMICA FOLICULAR OVÁRICA EN VACAS REPETIDORAS: ESTUDIO ECOGRÁFICO Y PERFIL DE PROGESTERONA [Internet]. Córdoba; 2004. Recuperado a partir de: <https://helvia.uco.es/handle/10396/2794>
23. Palomares S. Revisión de los protocolos empleados en la sincronización de celos en bovinos [Internet]. Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales - U.D.C.A; 2009. Recuperado a partir de: <https://docplayer.es/4598023-Revision-de-los-protocolos-empleados-en-la-sincronizacion-de-celos-en-bovinos.html>
24. Fernández Á. DINÁMICA FOLICULAR: FUNCIONAMIENTO Y REGULACIÓN [Internet]. 2003. p. 8-12. Recuperado a partir de: http://www.produccion-animal.com.ar/informacion_tecnica/inseminacion_artificial/23-ondas_foliculares.pdf
25. Palma G. Biotecnología de la reproducción. 1ra ED. Instituto nacional de tecnologia agropecuaria; 2001. 37-49 p.
26. Gregory RM, Melo LC, Beskow A, Mattos RC, Inês M, Jobim M, et al. Dinâmica folicular e uso de hormonioterapias na regulação do ciclo estral na vaca. Rev Bras Reprodução Anim Supl. 2009;6:148-52.
27. Findlay JK, Robertson DM, Clarke IJ, Klein R, Doughton BW, Xiao S. Plenary Session IV . Hormonal regulation . Chairperson : M . A . Driancourt (France) Hormonal regulation of reproduction concepts. 1992;28:319-28.
28. Evans ACO, Currie WD, Rawlings NC. Effects of naloxone on circulating



- gonadotrophin concentrations in prepubertal heifers. 1980;
29. Bo G, Adams G, Pierson R, Tribulo H, Caccia M, Mapletoft R. FOLLICULAR WAVE DYNAMICS AFTER ESTRADIOL ESTRADIOL-17P TREATMENT OF HEIFERS WITH OR WITHOUT A PROGESTOGEN IMPLANT. 1994;15.
 30. Zapata J. Comparación de los perfiles de progesterona, diámetro folicular y volumen luteal durante el ciclo estral entre vaquillas, primíparas, múltiparas y repetidoras en una hacienda del Cantón Mejía, Ecuador. [Internet]. UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO; 2015. Recuperado a partir de: <http://repositorio.usfq.edu.ec/bitstream/23000/4215/1/113899.pdf>
 31. Hsueh, A.J.W.; Billing, H.; Tsafirri A. Ovarian follicle atresia: a hormonally controlled apoptotic process. Endocr Rev. 1994;15:707-25.
 32. Rhodes F. Animal and temporal effects on ovarian follicular dynamics in Brahman heifers. Anim Reprod Sci. 1995;35(4):265-77.
 33. Ginther O, Wiltbank M, Fricke P, Gibbons J, Kot K. selection of the dominant follicle in cattle. En: Biol Reprod. 1996. p. 1187-94.
 34. Rodríguez L, Abuelo A, Bejar J, Cazapal C, López L, Pérez A, et al. El uso de la ecografía Doppler color en la reproducción [Internet]. 2013. Recuperado a partir de: <https://albeitar.portalveterinaria.com/noticia/11290/ARTICULOS-RUMIANTES/El-uso-de-la-ecografia-doppler-color-en-el-control-reproductivo-del-vacuno.html>
 35. Ferre L, Cattaneo L. Biotecnologías reproductivas: producción in vitro de embriones y semen sexado. (¿La pareja perfecta?). Rev Med Vet. 2013;94(2):28-36.
 36. Barañao L. Biotecnología en Reproducción animal. Dep Fisiol Biol Mol y Celular Fac Ciencias Exactas y Nat Univ Buenos Aires. 2007;
 37. Cabodevila E, Toarquatri S. Superovulação de Fêmeas bovinas. En: Biotecnologia de la reproduccion. 1ra ed. Argentina: INTA; 2001. p. 79-108.
 38. Ereno R. Dinâmica folicular em bovinos. São Paulo; 2002.



39. Machado L, Corrêa M, Pineschi L. Alternativas hormonais para programas de transferência de embriões em bovinos. 2003.
40. Rodríguez M, Vallejo A, Batista P, Espasandin AC. Biotecnologías reproductivas aplicadas a la mejora genética animal. Cangue [Internet]. 2011;31:44-50. Recuperado a partir de: http://www.eemac.edu.uy/cangue/joomdocs/cangue031_rodriguez.pdf
41. Medicina EDE, Zootecnia VY. Full-Text. :1-86.
42. MAPLETOF. Transfer en CIA de Embriones en Bovinos. 2006.
43. Motta P, Ramos N, González C, Castro E. Dinámica folicular en la vida reproductiva de la hembra bovina. 2016;(December).
44. Rippe CA, Veterinario M, Técnicos S. EL CICLO ESTRAL. 2009;
45. Sumano H, Luis O. FARMACOLOGÍA VETERINARIA. 3ra ed. México; 2006. 1061 p.
46. López L. Reutilización del DIB y del implante en vacas Cebú, sometidas a amamantamiento restringido en los llanos orientales [Internet]. 2010. Recuperado a partir de: <http://repository.lasalle.edu.co/bitstream/handle/10185/6384/T13.10L881r.pdf?sequence=1>
47. Soria M. Efecto del benzoato de estradiol en la morfometría del folículo y cuerpo lúteo en vacas holstein sincronizadas con D-cloprostenol. [Internet]. Universidad de Cuenca; 2013. Recuperado a partir de: <http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/529/1/TESIS.pdf>
48. Agrovvetmarket. Lutaprost ® - 250 [Internet]. Recuperado a partir de: <http://www.agrovvetmarket.com/Files/7a5a3c6c-613c-4276-ae73-01d6e2afc084.pdf>
49. Barbella S. PROSTAGLANDINA F2a Y LA REPRODUCCIÓN DE LOS BOVINOS. En p. 9. Recuperado a partir de: http://www.avpa.ula.ve/docuPDFs/libros_online/libro_reproduccionbovina/cap18.PDF
50. Torres L. Efecto de la administración de Cloprostenol Sodico sobre la tasa de concepción en vacas lecheras. 2009.
51. García L. Reproducción, Características del ciclo estral [Internet]. 2010.



- Recuperado a partir de: <https://www.engormix.com/ganaderia-carne/articulos/reproduccion-caracteristicas-ciclo-estral-t28254.htm>
52. Plumb D. Manual de farmacología veterinaria. 6ta ed. Buenos Aires; 2010. 1222 p.
 53. Bó G, Colazo M, Martínez M, Kastelic J, Mapletoft R. Sincronización de la emergencia de la onda folicular y la ovulación en animales tratados con progestágenos y diferentes esteres de estradiol. 2003;106:71-84.
 54. Jiménez C. Superovulación : estrategias , factores asociados y predicción de la respuesta superovulatoria en Bovinos. 2009;195-214. Recuperado a partir de: file:///Users/juandanielsupliguicha/Downloads/13769-41299-1-PB (1).pdf
 55. Bo G, Adams G, Pierson R, Tribulo H, Caccia M MR. Follicular wave dynamics after estradiol-17 treatment of heifers with or without a progestogen implant. Theriogenology. 1994;41:1555-69.
 56. Bo G, Adams G, Pierson R MR. Exogenous control of follicular wave emergence in cattle. Theriogenology. 1995;43:31-40.
 57. Sintex. Manejo farmacológico del ciclo estral del bovino [Internet]. 2005; 2005 [citado 26 de junio de 2017]. p. 1-5. Recuperado a partir de: http://www.produccion-animal.com.ar/informacion_tecnica/inseminacion_artificial/72-manejo_farmacologico_ciclo_estral_bovino.pdf
 58. Syntex. Benzoato de Estradiol Syntex® [Internet]. Buenos Aires; p. 1-4. Recuperado a partir de: [http://www.syntexar.com/usr/archivos/68_Ficha Técnica Benzoato de Estradiol Syntex®.pdf](http://www.syntexar.com/usr/archivos/68_Ficha_Tecnica_Benzoato_de_Estradiol_Syntex%reg;.pdf)
 59. Cárdenas R, Orlando E, Rueda A. Effect of applying gonadotropin releasing factors (GnRH) and estradiol benzoate on the development and size of follicles in Brahman cows. Revista CITECSA. Barrancabermeja; 2014;4:19-28.
 60. Martins CM, Nasser LF, Nogueira MFG, Barros CM, Bo GA. Superovulation and embryo transfer in *Bos indicus* cattle. 2006;65:77-88.
 61. Epinoza M. EFECTO DE DIFERENTES PROTOCOLOS PARA IATF SOBRE LAS TASAS DE PREÑEZ APLICADOS EN GANADO LECHERO.



- 2010;1-18. Recuperado a partir de:
http://www.iracbiogen.com.ar/admin/biblioteca/documentos/Trabajo_Final_Marcia_Espinosa.pdf
62. Massad A, Infante R, Mendoza J. EFECTO DE LA APLICACIÓN DE GNRH EN VACAS CRUZA CEBÚ CON CRIA AL PIE SOBRE LOS. 2012;1-14. Recuperado a partir de:
http://www.iracbiogen.com.ar/admin/biblioteca/documentos/TF_IRAC_Mendoza_Massad_Infante_arg_2008.pdf
63. Health MA. Agencia española de medicamentos y productos sanitarios. p. 1-4.
64. Fortune J. The early stages of follicular development: activation of primordial follicles and growth of preantral follicles. *Anim Reprod Sci.* 2003;78:135-63.
65. Webb R, Armstrong D. Control of ovarian function; effect of local interactions and environmental influences on follicular turnover in cattle: a review. *Livest Prod Sci.* 1998;53:95-112.
66. Quirk S, Cowan G, Harman R, Hu C, Porter D. Ovarian follicular growth and atresia: the relationship between cell proliferation and survival. *J Anim Sci.* 2004;82E-Suppl:E40-E52.
67. Adams G, Jaiswal R, Singh J, Malhi P. Progress in understanding ovarian follicular dynamics in cattle. *Theriogenology* 2008; 69: 72-80. *Theriogenology.* 2008;69:72-80.
68. Ginther O, Beg M, Bergfelt D, Donadeu F, Kot K. Follicle Selection in Monovular Species. *Biol Reprod.* 2001;65:638-47.
69. Forde N, Beltman M, Lonergan P, Diskin M, Roche J, Crowe M. Oestrous cycles in *Bos taurus* cattle. *Anim Reprod Sci* 2011; 124:163-9. *Anim Reprod Sci.* 2011;124:163-9.
70. Buratini J, Price C, Visintin J, Bo G. Effects of dominant follicle aspiration and treatment with recombinant bovine somatotropin (BST) on ovarian follicular development in Nelore (*Bos indicus*) heifers. *Theriogenology.* 2000;54(3):421-31.
71. Peter A, Levine H, Drost M, Bergfelt D. Compilation of classical and



- contemporary terminology used to describe morphological aspects of ovarian dynamics in cattle. *Theriogenology*. 2009;71:1343-57.
72. Ginther O, Wiltbank M, Fricke P, Gibbons J, Kot K. Selection of the Dominant Follicle in Cattle. *Biol Reprod*. 1996;55:1187-94.
 73. Nava H, Herández H. Aspiración folicular transvaginal. En: Programa de reproducción bovina [Internet]. Maracaibo; 2005. p. 612-4. Recuperado a partir de: https://www.academia.edu/7447805/Aspiración_folicular_transvaginal?en_ds_sutd_reg_path=true
 74. GINTHER O, KASTLI J, KNOFF L. Composition Bovine, and characteristics of follicular waves during the estrous cycle. *Anim Reprod Sci*. 1989;20:187.
 75. Perea F, González R, Cruz R, Soto E, Rincón E, González C, et al. Ultrasonographic evaluation of the follicular dynamics in crossbred dairy cows and heifer. *Rev CIENTÍFICA, FCV-LUZ* [Internet]. 1998;VIII:14-24. Recuperado a partir de: <http://www.produccioncientifica.luz.edu.ve/index.php/cientifica/article/view/File/14304/14282>
 76. SIROIS J, FORTUNE J. Ovarian follicular dynamics Real-time, during the estrous cycle in heifers monitored by untrasoundography. *Biol Reprod*. 1988;39:308.
 77. SAVIO J, BOLAND M, HYNNE N, ROCHE J. Resumption of follicular activity in the early period Post-partum, of dairy cows. *Reprod Fert*. 1990;88:569.
 78. KASTELIC J, PIERSON R, GINTHER O. Ultrasonic morphology of corpora lutea and central luteal cavities during the estrous cycle and early pregnancy in heifers. *Theriogenology*. 1990;34:487.
 79. OKANO A, TOMIZUKA T. Ultrasonic observation of postpartum uterine involution in the cow. *Theriogenology* 2. 1987;7:369.
 80. CURRAN S, PIERSON R, O G. Ultrasonographic appearance of the bovine conceptus from days 10 through 20. *J Am Vet Med As*. 1986;189:1289.
 81. CURRAN S, KASTELIC J, GINTHER O. Determining sex of the bovine fetus by ultrasonic assessment of the relative location of the genital



- tubercle. Anim Reprod Sci. 1989;19:217.
82. EDMONSON A, FISSORE R, PASHEN R, BONDURANT R. The use of ultrasonography for the study of the bovine reproductive tract. I. Normal and pathological ovarian structures. Anim Reprod Sci. 1986;12:157.
 83. Ayala L, Pesántez J, Rodas E, Méndez S, Soria M, Torres S, et al. Tamaño del folículo ovulatorio, cuerpo lúteo y progesterona sanguínea en vaquillas receptoras de embriones de tres razas en pastoreo en Ecuador. Rev prod anim, . 217d. C.;2:29.
 84. Owens R, Atkins T, Rahe C, Fleeger J, Harms P. Time-dependent loss of radioimmunoassayable levels of progesterone following ambient temperature incubation of heparinized bovine blood. Theriogenology [Internet]. 1980;305-9. Recuperado a partir de: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0093691X80900941?via%253Dihub>
 85. LIVEXLAB. Toma y envío de muestras al laboratorio manual de procedimientos [Internet]. p. 12. Recuperado a partir de: <http://www.livex.com.ec/uploads/documentos/Manual de Toma de muestras.pdf>
 86. Comité de Bioética. Guía para la correcta toma de sangre en bovinos [Internet]. Bogotá; Recuperado a partir de: [http://medicinaveterinariaydezootecnia.bogota.unal.edu.co/fileadmin/FVM Z/Servicios/bioetica/Pro_autorizados/001_Guia_toma_sangre_bovinos.pdf](http://medicinaveterinariaydezootecnia.bogota.unal.edu.co/fileadmin/FVM/Z/Servicios/bioetica/Pro_autorizados/001_Guia_toma_sangre_bovinos.pdf)
 87. Bonifaz M. UTILIZACIÓN DEL MÉTODO DE ELECTROQUIMIOLUMINISCENCIA PARA LA CUANTIFICACIÓN DE LA HORMONA FOLÍCULO ESTIMULANTE , LUTEINIZANTE Y ESTRADIOL EN MUJERES DE 45-55 AÑOS ETAPA DE CLIMATERIO, ATENDIDOS EN EL HOSPITAL IESS RIOBAMBA EN EL PERIODO ABRIAL A SEPTIEMBR [Internet]. Universidad Nacional de Chimborazo; 2016. Recuperado a partir de: <http://dspace.unach.edu.ec/bitstream/51000/2941/1/UNACH-FCS-LAB-CLIN-2016-0020.pdf>



88. Ortuño C, Loja J. Universidad de cuenca. 2016;85. Recuperado a partir de: [http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/24366/1/Tesis Ortuño Loja.pdf](http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/24366/1/Tesis%20Ortu%C3%B1o%20Loja.pdf)
89. Burke CR, Mussard ML, Gasser CL, Grum DE, Day ML. Estradiol benzoate delays new follicular wave emergence in a dose-dependent manner after ablation of the dominant ovarian follicle in cattle. *Theriogenology*. 2003;60(4):647-58.
90. Suárez DC, Gaviria MT, Gómez CJ. La buserelina en programas de superovulación para transferencia de embriones. *Rev Col Cienc Pec*. 2001;14(23):129-35.
91. Twagiramungu H, Guilbault L, Dufour J. Synchronization of ovarian follicular waves with a gonadotropin-releasing hormone agonist to increase the precision of estrus in cattle: a review. *Anim Sci [Internet]*. 1995;73:3141-51. Recuperado a partir de: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X9800065X?via%3Dihub>
92. Martinez MF, Adams GP, Bergfelt DR, Kastelic JP, Mapletoft RJ. Effect of LH or GnRH on the dominant follicle of the first follicular wave in beef heifers. *Anim Reprod Sci [Internet]*. 1999;57(1-2):23-33. Recuperado a partir de: [http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L29514531%0Ahttp://dx.doi.org/10.1016/S0378-4320\(99\)00057-3%0Ahttp://limo.libis.be/resolver?&sid=EMBASE&issn=03784320&id=doi:10.1016%2FS0378-4320%2899%2900057-3&atitle=Effect+of+LH+o](http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L29514531%0Ahttp://dx.doi.org/10.1016/S0378-4320(99)00057-3%0Ahttp://limo.libis.be/resolver?&sid=EMBASE&issn=03784320&id=doi:10.1016%2FS0378-4320%2899%2900057-3&atitle=Effect+of+LH+o)
93. Kohram H, Twagiramungu H, Bousquet D, Durocher J, Guilbault LA. Ovarian superstimulation after follicular wave synchronization with GnRH at two different stages of the estrous cycle in cattle. *Theriogenology*. 1998;49(6):1175-86.
94. Bergfelt DR, Lightfoot KC, Adams GP. OVARIAN SYNCHRONIZATION FOLLOWING ULTRASOUND-GUIDED TRANSVAGINAL FOLLICLE ABLATION IN HEIFERS. *Theriogenology [Internet]*. 1994;42:895-907. Recuperado a partir de:



UNIVERSIDAD DE CUENCA

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X9490113W?via%3Dihub>

95. HAMILTON. PS. SA. Dairy Grazing: Reproduction. Univ Missouri Extension M178,. 2012;1-6.
96. Chirinos M, et al. Impacto en el humano de aditivos hormonales en bovinos. Rev Invest Clin 2007; 59 (3): 206-211. Recuperado a partir de <http://www.medigraphic.com/pdfs/revinvcli/nn-2007/nn073f.pdf>

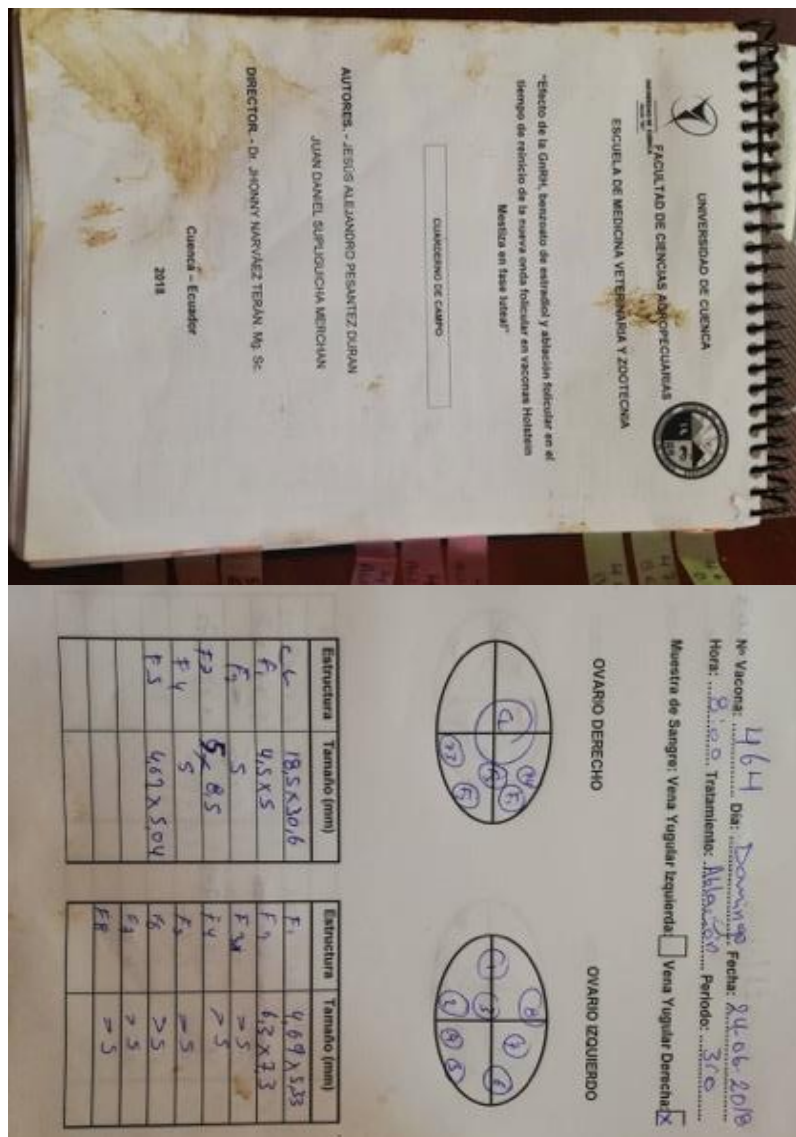


9. ANEXOS

Anexo 1. Prueba de normalidad, Shapiro-Wilk.

	Estadístico	gl	Sig.
PICO DE FSH	0,749	27	0,000
REINICIO DE LA NUEVA ONDA FOLICULAR	0,830	27	0,000
# DE FOLICULOS	0,933	27	0,081

Anexo 2. Cuaderno de campo.



Anexo 3. Manejo de los animales al establo para comenzar la sincronización.



Anexo 4. Sincronización del ciclo sexual.



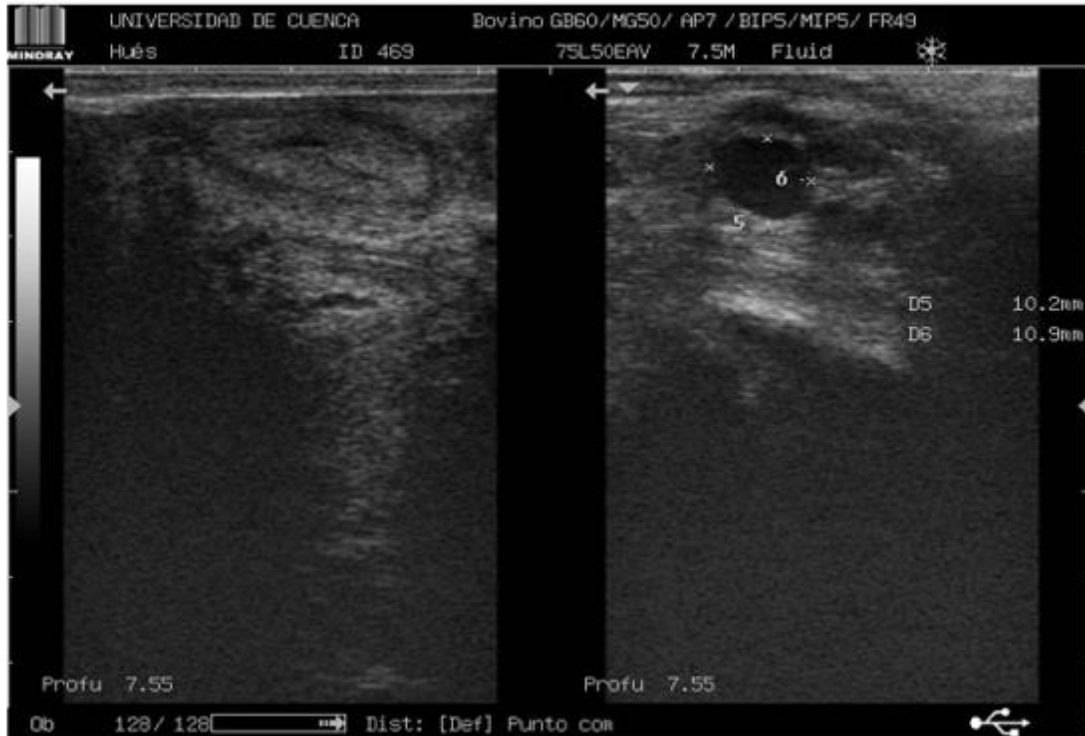
Anexo 5. Aplicación de los tratamientos.



Anexo 6. Monitoreo ecográfico de la onda folicular.



Anexo 7. Ecografía de folículo preovulatorio.



Folículo preovulatorio en ovario derecho con un tamaño promedio de 10.5 mm.

Anexo 8. Toma de muestras de sangre.

